

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica



**AZETIDINAS Y β -LACTAMAS DERIVADAS DE
AMINOÁCIDOS: SÍNTESIS Y DESCUBRIMIENTO
DE NUEVOS COMPUESTOS BIOACTIVOS**

TESIS DOCTORAL

PAULA PÉREZ FAGINAS

**Directora: Dra. Rosario González Muñiz
Madrid, 2010**

ÍNDICE

	Página
NOTA SOBRE NOMENCLATURA	9
NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y NUMERACIÓN	9
ABREVIATURAS UTILIZADAS	11
ANEXOS	13
INTRODUCCIÓN GENERAL Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	19
1. AMINOÁCIDOS COMO PRECURSORES DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS	21
2. HETEROCICLOS NITROGENADOS DE CUATRO MIEMBROS A PARTIR DE AMINOÁCIDOS	24
3. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 1: DIPÉPTIDOS AZETIDÍNICOS COMO INHIBIDORES DE CMVH	33
1.1. INTRODUCCIÓN	35
1.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	43
1.3. OBJETIVOS	45
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
1.4.1. Síntesis	47
1.4.1.1. Síntesis de azetidinas precursoras	47
1.4.1.2. Síntesis de derivados modificados en el grupo amida (serie A)	49
1.4.1.3. Síntesis de derivados modificados en la cadena lateral del aminoácido en C-terminal (serie B)	51
1.4.1.4. Síntesis de derivados con diferentes sustituyentes en el nitrógeno azetidínico (serie C)	53
1.4.2. Estudios conformacionales por RMN	57
1.4.3. Evaluación biológica	63

1.5. CONCLUSIONES	69
1.6. PARTE EXPERIMENTAL	71
1.6.1. Síntesis en disolución de azetidinas precursoras	71
1.6.2. Síntesis de derivados modificados en el grupo amida (serie A)	76
1.6.2.1. Procedimiento general para la preparación de compuestos Boc-Ala-NR ¹ R ²	76
1.6.2.2. Procedimiento general para la síntesis de H-Ala-NR ¹ R ²	78
1.6.2.3. Procedimiento general para la reacción de acoplamiento en disolución	79
1.6.3. Síntesis en fase sólida de derivados modificados en la cadena lateral del aminoácido C-terminal (serie B) y en el sustituyente del nitrógeno azetidínico (serie C)	87
1.6.3.1 Métodos analíticos	87
1.6.3.2. Protocolos generales de síntesis en fase sólida	88
1.6.4. Evaluación de la inhibición de la replicación viral del CMVH	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
 CAPÍTULO 2: β-LACTAMAS 1,3,4,4-TETRASUSTITUIDAS: SÍNTESIS Y APLICACIONES	 111
2.1. INTRODUCCIÓN	113
2.1.1. Importancia biológica de las β-lactamas	113
2.1.2. Las β-lactamas como intermedios en la generación de diversidad estructural	117
2.1.3. Peptidomiméticos β-lactámicos	119
2.1.4. Métodos de síntesis de β-lactamas	121
2.1.4.1. Métodos de síntesis en disolución	121
2.1.4.2. Métodos de síntesis en fase sólida	127
2.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	131
2.3. OBJETIVOS	135
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	137
2.4.1. Síntesis en disolución de β-lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas	137
2.4.1.1. Desarrollo del esquema sintético	137

2.4.1.2. Asignación de la configuración en las β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas	145
2.4.1.3. Estudio del mecanismo de formación de las β -lactamas	151
2.4.1.4. Síntesis y estudio de β -lactamas 1,3,4-trisustituidas derivadas de glicina	155
2.4.2. Síntesis en disolución de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas	159
2.4.3. Evaluación biológica	175
2.4.3.1. Evaluación biológica como agentes antivirales	175
2.4.3.2. Evaluación biológica como moduladores de canales iónicos	176
2.4.3.3. Evaluación biológica como agentes antitumorales	177
2.4.3.4. Intentos de optimización de la actividad antitumoral de 2.77a	178
a) Modificaciones en el grupo <i>p</i> -metoxibencilo	179
b) Sustitución del éster metílico por diferentes grupos amida	184
c) Sustitución del grupo 4-bencilo por otros grupos aromáticos	185
d) Evaluación biológica de las nuevas series de derivados β -lactámicos	190
2.5. CONCLUSIONES	195
2.6. PARTE EXPERIMENTAL	197
2.6.1. Síntesis en disolución de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas	197
2.6.1.1 Preparación de <i>N</i> -alquil derivados de aminoácidos	197
2.6.1.2. Preparación de <i>N</i> -alquil- <i>N</i> -cloropropionil derivados de aminoácidos	204
2.6.1.3. Ciclación a las 2-azetidinonas	213
2.6.2. Procedimiento general para las reacciones de saponificación	220
2.6.3. Procedimiento general para las reacciones de acoplamiento	222
2.6.4. Síntesis de (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-bencil-4-hidroximetil-3-metil-1- <i>p</i> -metoxibencil-2-azetidinona (2.88)	229
2.6.5. Síntesis de (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4- <i>p</i> -hidroxibencil-3-metil-1- <i>p</i> -metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (2.163)	230
2.6.6. Síntesis en fase sólida de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas	231

2.6.7. Cálculos ab initio de estados de transición	249
2.6.8. Ensayos biológicos	249
2.6.8.1. Evaluación de la inhibición de la replicación viral del CMVH	249
2.6.8.1. Evaluación de la capacidad bloqueante de los canales iónicos TRPV1 y TRPM8	249
2.6.8.3. Evaluación de la actividad antitumoral	250
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	251

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides”, *Pure & Appl. Chem.*, **1984**, 56, 595).

Los aminoácidos se nombran mediante el sistema de símbolos de tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo de tres letras del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina *N*-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina *C*-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo *N*-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo *C*-terminal.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y NUMERACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la Memoria de esta Tesis. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el diccionario panhispánico de dudas, desde su primera edición en Octubre de 2005.

La numeración de los compuestos se ha realizado por capítulos. Así, el primer número de cada producto representa el capítulo en que se describe el mismo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en *Guidelines for Authors (J. Org. Chem.* **2008**, 73). Algunas abreviaturas poco frecuentes se indican a continuación:

BEMP	2- <i>terc</i> -Butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina
Boc	<i>terc</i> -Butoxicarbonilo
BOP	Hexafluoruro de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(dimetilamino)fosfonio
BroP	Hexafluoruro de bromo-tris(dimetilamino)fosfonio
BTC	Carbonato de bis(2,2,2)tricloroetilo
CAN	Nitrato cérico amónico
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CCK	Colecistoquinina
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
Chx	Ciclohexilo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CMVH	Citomegalovirus humano
DCM	Diclorometano
DEAD	Dietilazadicarboxilato
DIAD	Diisopropilazadicarboxilato
DIEA	Diisopropiletilamina
DMTMM	4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolina
EM-ES	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
GI ₅₀	Concentración requerida para inhibir la proliferación celular al 50%
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HOAt	1-Hidroxiazabenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol

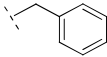

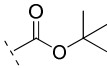
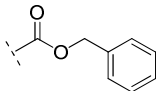
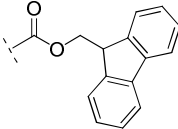
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas
LHMDS	Bis(trimetilsilil)amiduro de litio
MCC	Concentración citotóxica mínima
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
NMP	<i>N</i> -Metilpirrolidona
NOE	Efecto nuclear Overhauser
Pmb	<i>p</i> -Metoxibencilo
ppb	Partes por billón
PyAOP	Hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfonio
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfonio
PyBroP	Hexafluorofosfato de bromo-tris(pirrolidino)fosfonio
SARS	Síndrome agudo respiratorio severo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TEA	Trietilamina
TFFH	Hexafluorofosfato de fluoro- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilformamidinio
TIPS	Triisopropilsilano
TMOF	Ortoformiato de trimetilo
t_R	Tiempo de retención
TRP	Receptores de potencial transitorio
TRPM8	Receptor de potencial transitorio subfamilia melastatina tipo 8
TRPV1	Receptor de potencial transitorio subfamilia vainilloide tipo 1
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VZV	Virus varicela zoster
Xaa	Cualquier aminoácido
Z	Benciloxicarbonilo

ANEXO I: AMINOÁCIDOS

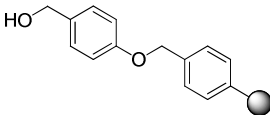
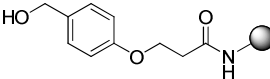
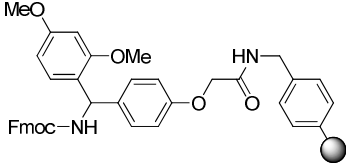
Ácido Aspártico	Asp	D		Isoleucina	Ile	I	
Ácido Glutámico	Glu	E		Leucina	Leu	L	
Alanina	Ala	A		Lisina	Lys	K	
Arginina	Arg	R		Metionina	Met	M	
Asparagina	Asn	N		Prolina	Pro	P	
Cisteína	Cys	C		Serina	Ser	S	
Glutamina	Gln	Q		Tirosina	Tyr	Y	
Glicina	Gly	G		Treonina	Thr	T	
Fenilalanina	Phe	F		Triptófano	Trp	W	
Histidina	His	H		Valina	Val	V	

Las abreviaturas de los aminoácidos siguen la regla de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC- IUB: *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37 y *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 633-6

ANEXO II: GRUPOS PROTECTORES

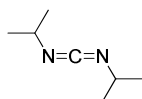
Bencilo	Bzl	
<i>tert</i> -Butilo	<i>t</i> Bu	
<i>tert</i> -Butoxicarbonilo	Boc	
Benciloxicarbonilo	Z	
9-Fluorenilmetoxicarbonilo	Fmoc	

ANEXO III: RESINAS

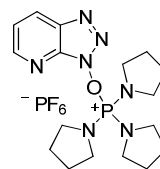
Wang	
MPPA-Wang	
Rink Amida	

ANEXO IV: AGENTES DE ACOPLAMIENTO

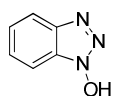
DIC



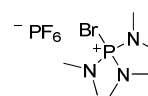
PyAOP



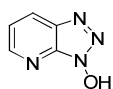
HOBt



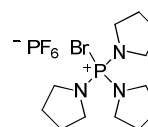
BroP



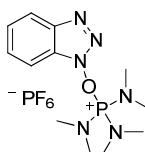
HOAt



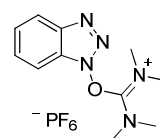
PyBroP



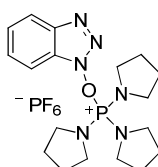
BOP



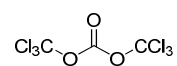
HATU



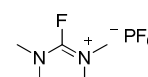
PyBOP



BTC



TFFH



Esta Tesis ha sido realizada en el Instituto de Química Médica (CSIC). Se enmarca dentro de los proyectos SAF 2003-07207-C02-01 y SAF 2006-01205.

La autora agradece la financiación otorgada por el CSIC mediante la concesión de una beca I3P, gracias a la que ha sido posible la realización de este trabajo.

INTRODUCCIÓN GENERAL Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

1. AMINOÁCIDOS COMO PRECURSORES DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS

La preparación de compuestos estructuralmente complejos y diversos contribuye a poblar el espacio químico disponible y facilita el estudio de los sistemas biológicos¹. En este sentido, la síntesis asimétrica de compuestos heterocíclicos ha recibido una especial atención en los últimos años², debido a las importantes actividades biológicas mostradas por este tipo de compuestos³. En muchos casos, estos heterociclos están basados, total o parcialmente, en esqueletos de productos naturales, compuestos biosintéticos con arquitecturas normalmente complejas y con estereocentros quirales, que siguen teniendo un papel principal en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos⁴⁻⁶.

Del arsenal de sustratos quirales disponible, los aminoácidos, debido a su versatilidad, han sido muy usados en la síntesis de heterociclos quirales enantioméricamente puros^{7,8}. Los aminoácidos proteinogénicos poseen un número limitado pero significativo de grupos funcionales que propician su manipulación sintética. Además, los protocolos de protección/desprotección/activación están muy bien documentados y existen muchos derivados comerciales disponibles en ambas formas enantioméricas. Se han descrito multitud de metodologías, tanto en disolución como en fase sólida, en las que diferentes aminoácidos se incorporan total o parcialmente en el sistema heterocíclico final^{8,9}. En las figuras 1 y 2 se recogen algunas transformaciones generales de aminoácidos en heterociclos sencillos y las aplicaciones de ciertos aminoácidos concretos a la preparación de sistemas más elaborados, respectivamente. Así, son numerosos los ejemplos de derivados de aziridinas (**I**), hidantoínas (**II**), imidazolonas (**III**), dicetopiperazinas (**IV**) y benzodiazepinas (**V**) preparados a partir de aminoácidos (Figura 1)⁸⁻¹⁰. Por otra parte, derivados de triptófano y tirosina, entre otros, constituyen excelentes productos de partida para la generación de esqueletos de diferentes productos naturales^{11,13}, mientras que derivados de serina, treonina y cisteína constituyen la base de sistemas heteroaromáticos que incorporan anillos de oxazol y tiazol¹⁴, como los de los tiopéptidos antibióticos (Figura 2).

Aunque los aminoácidos se han utilizado también profusamente como auxiliares quirales temporales en la inducción de asimetría¹⁵, y el uso de derivados de prolina como organocatalizadores se expande de manera vertiginosa^{16,17}, estos aspectos no se contemplan aquí por estar muy alejados de los objetivos de esta Tesis.

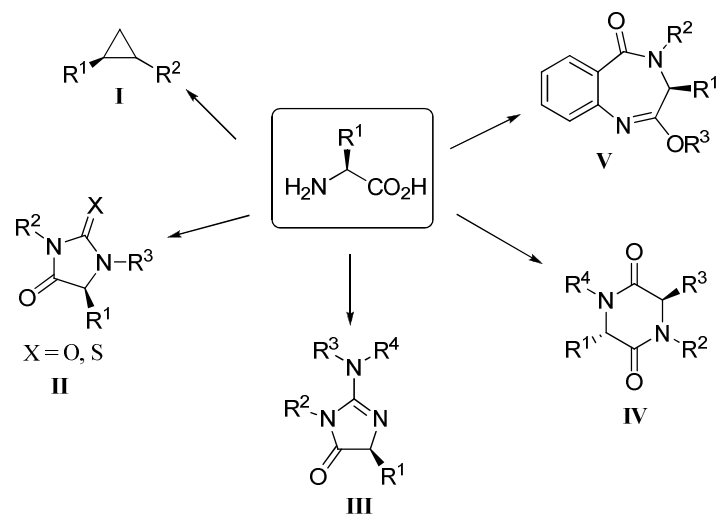


Figura 1. Algunos sistemas heterocíclicos sencillos preparados a partir de aminoácidos

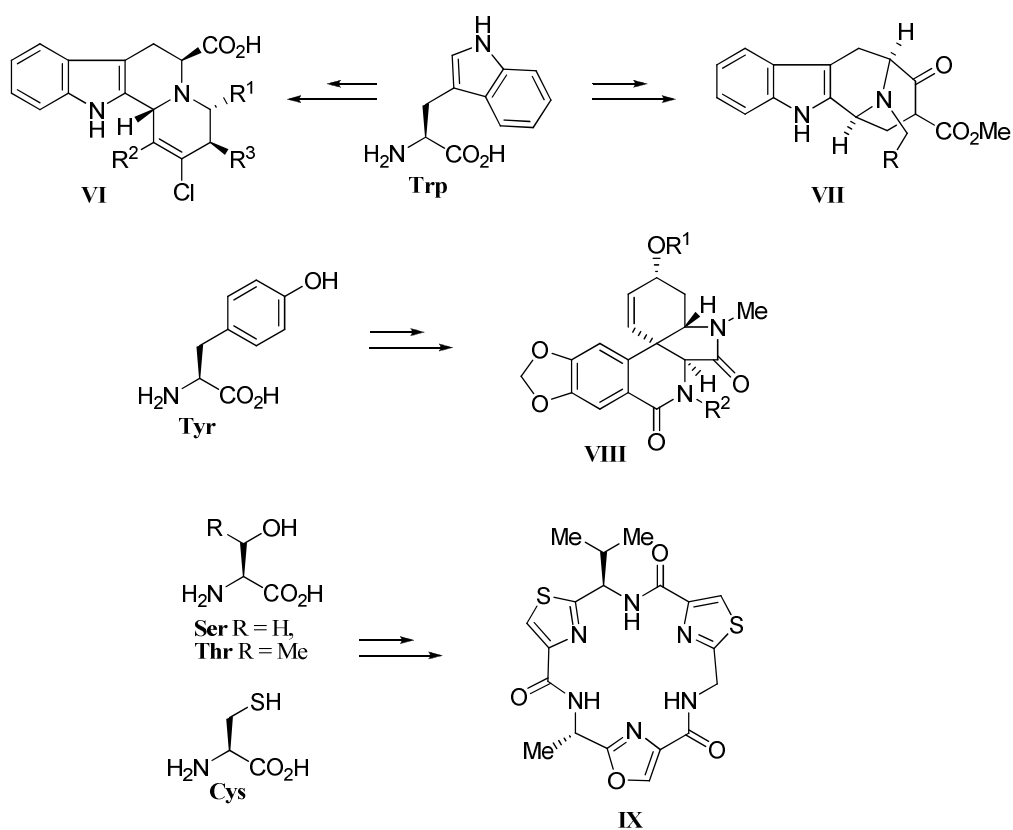


Figura 2. Esqueletos de productos naturales derivados de Trp, Tyr y Ser(Thr)-Cys

Nuestro grupo de investigación viene trabajando durante las dos últimas décadas en la síntesis de heterociclos quirales, mediante transformaciones químicas de derivados de aminoácidos y péptidos pequeños, para ser utilizados después en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Algunas de las aportaciones más significativas se indican en la Figura 3, que recoge los sistemas tetracíclicos de hexahidroindolizino[8,7-b]indol **X** (IBTM) y hexahidropirrol[1',2',3':1,9a,9]imidazo[1,2-a]indol, generados a partir de triptófano^{18,19}, y el sistema bicíclico de perhidropirido[1,2-c]pirimidinona (**XI**), obtenido mediante transformaciones químicas de derivados de Orn²⁰. Modificaciones apropiadas de los sistemas heterocíclicos **X** y **XI** han permitido el descubrimiento de dos familias de antagonistas potentes y selectivos de los receptores de CCK tipo 1²¹, así como el hallazgo de nuevos compuestos prototipo con actividad antitumoral y estructura totalmente novedosa en el caso de **XII**²².

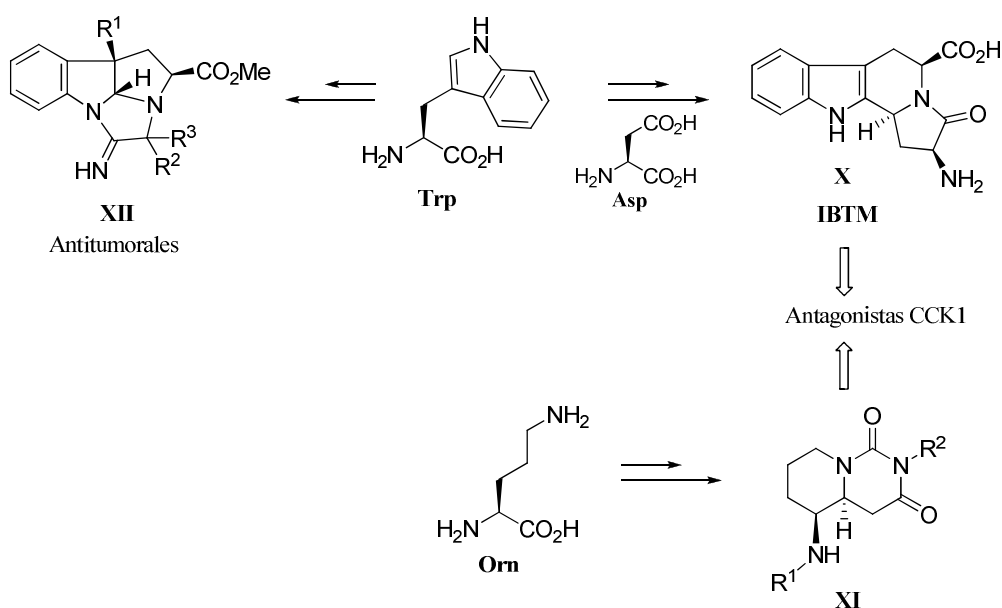


Figura 3. Ejemplos representativos de heterociclos quirales generados en nuestro grupo

2. HETEROCICLOS NITROGENADOS DE CUATRO MIEMBROS A PARTIR DE AMINOÁCIDOS

En comparación con sus homólogos superiores de 5 y 6 eslabones, los azaheterociclos de cuatro miembros han despertado un menor interés en la comunidad química²³, a pesar de la indiscutible importancia de las β -lactamas como agentes bioactivos e intermedios sintéticos (para más detalles ver la introducción del capítulo 2). Menor aún es la atención prestada a las azetidinas, posiblemente debido a la dificultad en la formación del anillo tensionado de 4 miembros²³. Sin embargo, en la última década, se han descrito algunos derivados sintéticos que contienen este anillo heterocíclico y poseen aplicaciones como herramientas farmacológicas en química médica. En la Figura 4 se recogen algunos ejemplos representativos²⁴, así como la estructura de dos fármacos comerciales que poseen anillos de azetidina, el Azelnidipino (**XVI**)²⁵, un bloqueador de canales de Ca^{2+} , y el Ximelagatran (**XVII**)²⁶, un inhibidor selectivo de trombina.

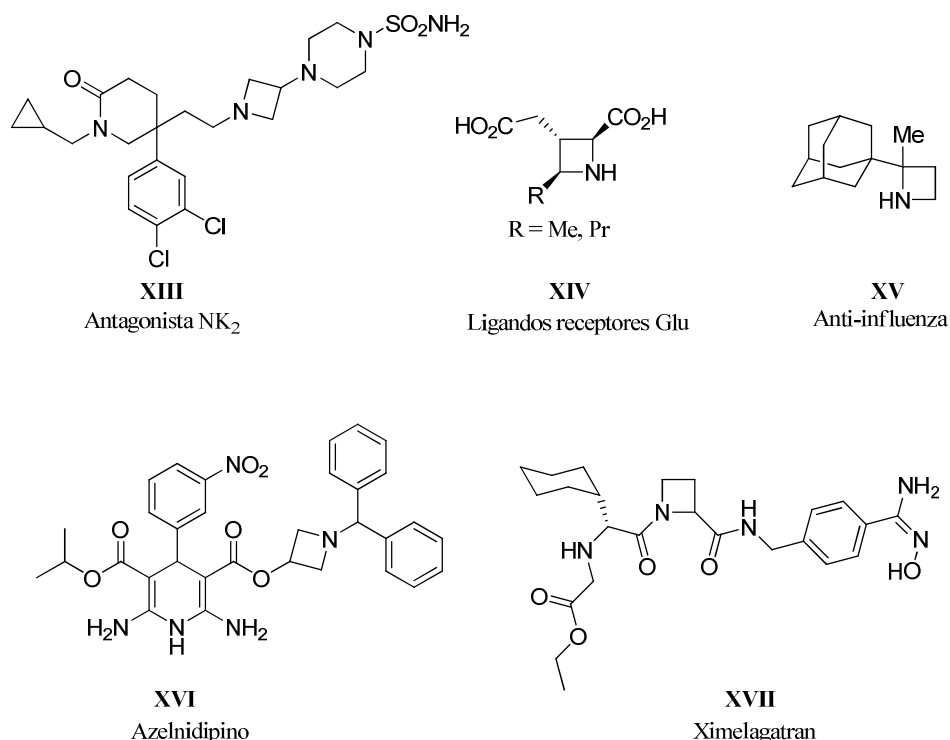


Figura 4. Derivados azetidínicos con actividades biológicas relevantes

Aunque de manera bastante limitada, los aminoácidos se han utilizado como precursores quirales de β -lactamas en algunos esquemas sintéticos. Así, como se muestra en la Figura 5, se puede destacar el empleo de iminas derivadas de serina y treonina (**XIX**)²⁷ o de diazocetonas derivadas de aminoácidos (**XXI**)²⁸ como intermedios en la reacción de Staudinger y la ciclación N1-C2 de derivados del ácido aspártico (**XXV**) o de otros β -aminoácidos (**XXVII**)^{29,30}. También se ha descrito la transformación de derivados de piroglutámico (**XXIX**) en β -lactamas útiles como intermedios para la síntesis de antibióticos carbapenems³¹.

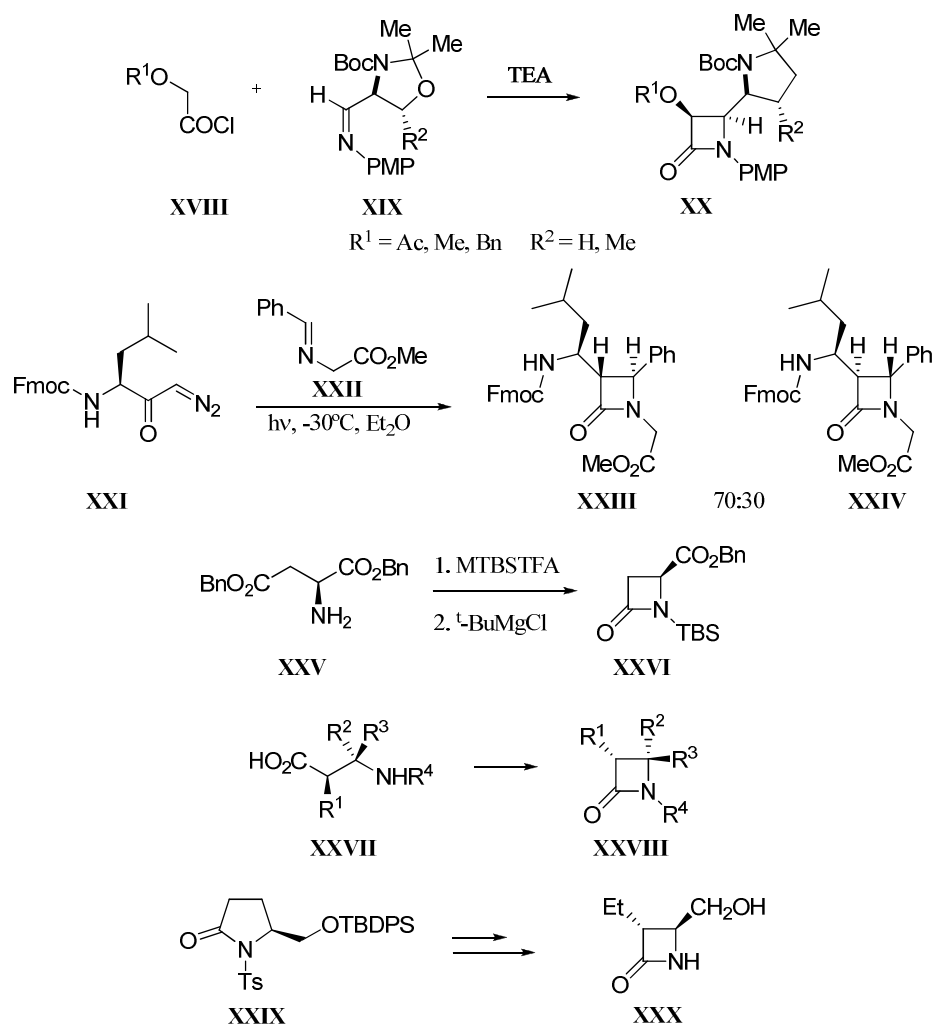


Figura 5. β -Lactamas a partir de aminoácidos

En la Figura 6 se ilustran algunos de los escasos esquemas sintéticos en los que se utilizan derivados de aminoácidos como precursores del anillo de azetidina. Destacar la formación de sales de azetidinio enantiopuras, que pueden después hidrogenolizarse a las correspondientes azetidinas, a partir de aldehídos y de α -halometilketonas derivados de *N,N*-dibencilaminoácidos (**XXXI**)³². Asimismo, el tratamiento con amiduros de Li de *N*-haloetil derivados de glicina conduce a 2-carboxiazetidinas **XXXIV** en forma racémica o como mezcla de diastereoisómeros, dependiendo del sustituyente R^1 sobre el átomo de nitrógeno³³. Por otra parte, el acoplamiento intramolecular electroreductivo de iminas derivadas de aminoácidos y compuestos alcoxycarbonílicos es un método muy elegante para la preparación enantioselectiva de azetidinas altamente funcionalizadas (**XXXVI**, **XXXVIII**)³⁴.

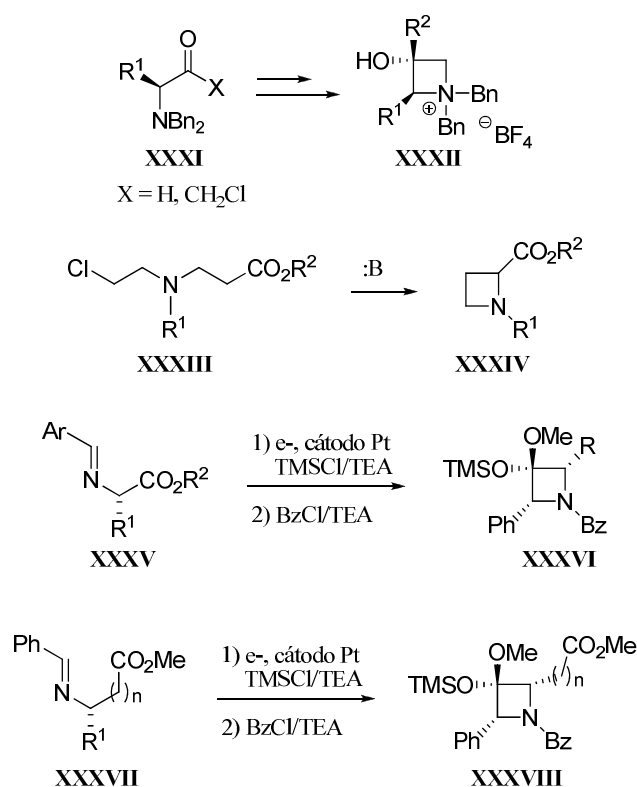


Figura 6. Azetidinas a partir de aminoácidos

Hace aproximadamente una década y de manera fortuita descubrimos que la ciclación de *N*-cloroacetyl derivados de tripéptidos conducía con buenos rendimientos a β -lactamas 1,4,4-trisustituídas, mediante ciclación intramolecular para formar el enlace C3-C4³⁵. Este resultado inesperado constituyó el inicio de una nueva línea de investigación dedicada a la preparación a partir de aminoácidos de este tipo de β -lactamas, con un patrón de sustitución poco habitual, y al estudio posterior de sus aplicaciones (Figura 7)³⁵⁻³⁷. Por una parte, la realización de modificaciones adecuadas en la 2-azetidinona derivada de fenilalanina **XL** ($R^1 = CH_2Ph$) y su correspondiente azetidina **XLI**³⁸, obtenida por reducción quimioselectiva de la primera, han permitido descubrir nuevos compuestos con actividad antiviral frente a citomegalovirus³⁹ (ver detalles en la introducción y antecedentes del capítulo 1). Por otra parte, estos derivados de azetidina, que son aminoácidos conformacionalmente restringidos, se están abriendo camino como inductores de giros inversos de la estructura secundaria peptídica⁴⁰.

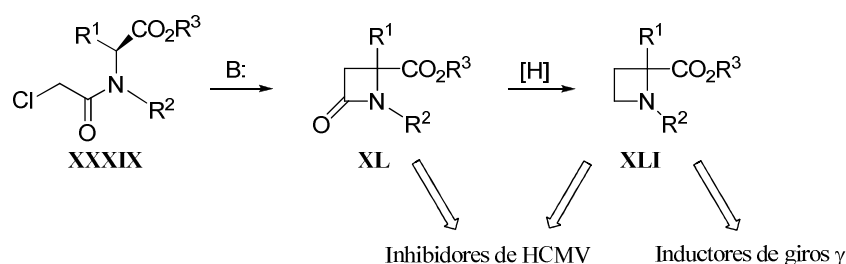


Figura 7. Nuestra contribución previa a la síntesis y aplicaciones de β -lactamas y azetidinas derivadas de aminoácidos

A pesar de que nuestras investigaciones en la síntesis y aplicaciones de las β -lactamas y azetidinas derivadas de aminoácidos han avanzado considerablemente, quedan aún diversos aspectos por abordar o por estudiar en mayor profundidad. En este sentido, la presente Tesis constituye la continuación de dos Tesis anteriores del grupo en este campo^{35,36}.

3. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Partiendo de los antecedentes señalados en el apartado anterior, la tesis se estructura en los dos capítulos independientes que se indican seguidamente:

Capítulo 1: Dipéptidos azetidínicos como inhibidores de CMVH

A partir de dipéptidos prototipo descubiertos en la Tesis de Guillermo Gerona se pretende su optimización en términos de actividad y toxicidad mediante la realización de modificaciones de las moléculas iniciales.

Capítulo 2: β -Lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas: síntesis y aplicaciones

Con el fin de profundizar y avanzar en nuestro método de síntesis de β -lactamas y de ampliar el patrón de sustitución en estas 2-azetidionas, se planteó la extensión del protocolo desarrollado inicialmente a la síntesis de derivados 1,3,4,4-tetrasustituidos. Entre los objetivos perseguidos están además: a) el estudio de la influencia de un centro estereogénico adicional en la estereoselectividad global del proceso y, en particular, sobre el fenómeno de memoria de quiralidad; b) la posible extensión del procedimiento a metodologías de fase sólida; y c) la búsqueda de nuevas actividades biológicas para los derivados β -lactámicos preparados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Jacoby, E.; Mozzarelli, A. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4374-4381.
- 2) *Asymmetric Synthesis of Nitrogen Heterocycles*. Royer, J., Ed. Wiley-VCH: Weinheim **2009**.
- 3) Bioactive Heterocycles I-VII. En *Topics in Heterocyclic Chemistry*. Gupta, R. R., Ed. Springer-Verlag: Berlin **2006**, V-6; **2007**, V-8-11; **2008**, V-15; **2009**, V-16.
- 4) Harvey, A. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 480-484.
- 5) Hübel, K.; Leßmann, T.; Waldmann, H. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1361-1374.
- 6) Kumar, K.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3224-3242.
- 7) Coppola, G. M.; Schuster, H. F. *Asymmetric Synthesis. Construction of Chiral Molecules Using Amino Acids*. Wiley: New York **1987**.
- 8) Sardina, F. J.; Rapoport, H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1825-1872.
- 9) Nefzi, A.; Ostresh, J. M.; Yu, J.; Houghten, R. A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3603-3609.
- 10) Dinsmore, C. J.; Beshore, D. C. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3297-3312.
- 11) Nören-Müller, A.; Reis-Correa, Jr., I.; Prinz, H.; Rosenbaum, C.; Saxena, K.; Schwalbe, H.; Vestweber, D.; Cagna, G.; Schunk, S.; Schwarz, O.; Schieve, H.; Waldmann, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10606-10611.
- 12) Nören-Müller, A.; Wilk, W.; Saxena, K.; Schwalbe, H.; Kaiser, M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5973-5973.
- 13) Baxendale, I. R.; Ley, S. V.; Piutti, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2194-2197.
- 14) Hughes, R. A.; Moody, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7930-7954.
- 15) Waldmann, H. *Synlett* **1995**, 133-141.
- 16) Dalko, P. I.; Moisan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138-5175.
- 17) Paradowska, J.; Stodulski, M.; Mlynarski, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4288-4297.
- 18) a) De la Figuera, N.; Rozas, I.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *Chem. Commun.* **1994**, 613-614. b) Andreu, D.; Ruiz, S.; Carreño, C.; Alsina, J.; Albericio, F.; Jiménez, M. A.; De la Figuera, N.; Herranz, R.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10579-10586.
- 19) a) González-Vera, J. A.; García-López, M. T.; Herranz, R. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2641-2644. b) González-Vera, J. A.; García-López, M. T.; Herranz, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5395-5398. c) González-Vera, J. A.; García-López, M. T. and Herranz, R. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, *5*, 209-221.
- 20) Martín-Martínez, M.; Bartolome-Nebreda, J. M.; Gómez-Monterrey, I.; González-Muñiz, R.; García-López, M.T.; Ballaz, S.; Barber, A.; Fortuño, A.; Del Rio, J.; Herranz, R. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3402-3407.

- 21) a) Ballaz, S.; Barber, A.; Fortuño, A.; Del Río, J.; Martín-Martínez, M.; Gómez-Monterrey, I.; Herranz, R.; González-Muñiz, R.; García-López, M. T. *Br. J. Pharmacol* **1997**, *121*, 759-767. b) Martín-Martínez, M.; Marty, A.; Jourdan, M.; Escrieux, C.; Archer, E.; González-Muñiz, R.; García-López, M.T.; Maigret, B.; Herranz, R.; Fourmy, D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4842-4850. c) Martín-Martínez, M.; De la Figuera, N.; Latorre, M.; García-López, M.T.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río J.; González-Muñiz, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4842-4850. 7667-7674.
- 22) Ventosa Andrés, P.; González-Vera, J. A.; Valdivielso, A. M.; García-López, M. T.; Herranz, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9313-9322.
- 23) a) Brandi, A.; Cicchi, S.; Cordero, F. M. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3988-4035. b) Couty, F.; Evano, G. *Synlett* **2009**, 3053-3064.
- 24) a) MacKenzie, A. R.; Marchington, A. P.; Middleton, D. S.; Newman, S. D.; Jones, B. C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5365-5377. b) Brüner-Osborne, H.; Bunch, L.; Chopin, N.; Couty, F.; Evano, G.; Jensen, A. A.; Kusk, M.; Nielsen, B.; Rabasso, N. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3926-3936. c) Zoidis, G.; Fytas, C.; Papanastasiou, I.; Foscolos, G. B.; Fytas, G.; Padalko, E.; De Clercq, E.; Naesens, L.; Neyts, J.; Kolocouris, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3341-3348.
- 25) Hegde, S.; Carter, J. *Ann. Rep. Med. Chem.* **2004**, *39*, 337-368.
- 26) Hegde, S.; Schmidt, M. *Ann. Rep. Med. Chem.* **2005**, *40*, 444-473.
- 27) Palomo, C.; Cossio, F. P.; Cuevas, C.; Lecea, B.; Mielgo, A.; Román, P.; Luque, A.; Martínez-Ripoll, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9360-9369.
- 28) Maier, T. C.; Poedlech, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4379-4386.
- 29) Hanessian, S.; Sumi, K.; Vanasse, B. *Synlett* **1992**, 33-34.
- 30) Kanwar, S.; Sharma, S. D. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 1748-1752.
- 31) Somfai, P.; He, H. M.; Tanner, D. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 283-286.
- 32) a) Concellón, J. M.; Bernad, P. L.; Pérez-Andrés, J. A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1231-1234. b) Concellón, J. M.; Riego, E.; Bernad, P. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1299-1301.
- 33) a) De Nicola, A.; Einhorn, C.; Einhorn, J.; Luche, J. L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 879-880. b) Couty, F.; Evano, G.; Vargas-Sánchez, M.; Bouzas, G. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9028-9031.
- 34) a) Kise, N.; Ozaki, H.; Moriyama, N.; Ueda, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11591-11596. b) Kise, N.; Hirano, Y.; Tanaka, Y. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 123-126.
- 35) Guillermo Gerona Navarro, Tesis Doctoral: Generación de diversidad molecular a partir de aminoácidos. Síntesis y aplicaciones de nuevas β -lactamas e hidantoínas. Facultad de Químicas, UCM, 2002.
- 36) M^a Angeles Bonache de Marcos, Tesis Doctoral: β -Lactamas derivadas de aminoácidos: Síntesis enantioselectiva, transformaciones y aplicaciones químico-médicas. Facultad de Farmacia, UCM, 2005.

- 37) a) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M.A.; Herranz, R.; García-López, M.T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3538-3547. b) Gerona-Navarro, G.; García-López, M.T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3953-3956. c) Bonache, M.A.; Gerona-Navarro, G.; Martín-Martínez, M.; García-López, M.T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Synlett* **2003**, 1007-1011. d) Bonache, M.A. Gerona-Navarro, G. García-Aparicio, C. Alías, M. Martín-Martínez, M. García-López, M.T. López, P. Cativiela, C. González-Muñiz, R. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14*, 2161-2169. e) Gerona-Navarro, G.; Royo, M.; García-López, M.T.; Albericio, F.; González-Muñiz, R. *Molecular Diversity* **2003**, *6*, 75-84.
- 38) Gerona-Navarro G.; Bonache M.A.; Alias M.; Pérez de Vega, M.J.; García-López, M.T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2193-2196.
- 39) Gerona-Navarro G.; Pérez de Vega M.J.; Garcia-Lopez M.T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; González-Muñiz, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2253-2256. B) Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; González-Muñiz R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2612-2621.
- 40) a) Baeza, J. L.; Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1704-1715. b) Baeza, J. L.; Gerona-Navarro, G.; Thompson, K.; Pérez de Vega, M. J.; Infantes, L.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8203-8211.

CAPÍTULO 1

DIPÉPTIDOS AZETIDÍNICOS COMO INHIBIDORES DE CMVH

1.1. INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano (CMVH) es un miembro de la familia de los virus herpes que infecta aproximadamente al 80% de la población mundial. Aunque su presencia en individuos sanos suele ser asintomática, el CMVH es el responsable de numerosas infecciones oportunistas en individuos inmunocomprometidos, tales como enfermos de SIDA, pacientes transplantados y niños recién nacidos¹.

Entre las manifestaciones clínicas más importantes causadas por este virus se encuentran la neumonía, hepatitis y retinitis en enfermos de SIDA, así como diversas infecciones gastrointestinales como colitis o esofagitis¹. Además, el CMVH juega un papel importante en el desarrollo de otras enfermedades como la arterioesclerosis, debido a que influye en el aumento de la proliferación celular y en el metabolismo del colesterol.

En la actualidad existen cinco fármacos cuyo uso ha sido aprobado para combatir las infecciones causadas por CMVH² (Figura 1.1): Ganciclovir (**1.1**), cuyo uso en clínica ha sido desplazado por su profármaco Valganciclovir (**1.2**), Cidofovir (**1.3**), Foscarnet (**1.4**) y Fomivirsén (**1.5**). Los cuatro primeros compuestos actúan a nivel de la DNA polimerasa, inhibiendo la síntesis del DNA viral. Fomivirsén es el primer oligonucleótido antisentido que obtuvo la aprobación de la FDA para combatir la retinitis en enfermos de SIDA.

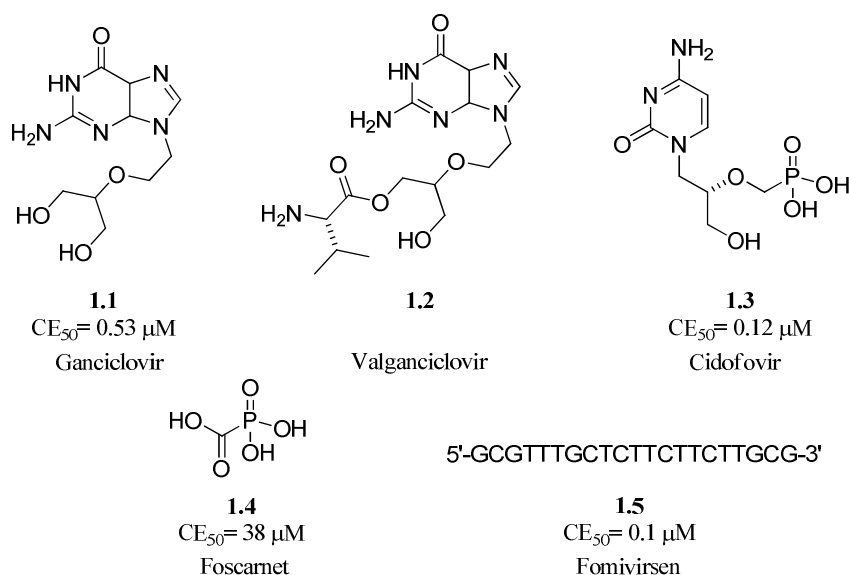


Figura 1.1. Fármacos aprobados para el tratamiento de infecciones causadas por CMVH.
(CE₅₀, concentración requerida para reducir la formación del virus al 50%)

Estos fármacos han servido para paliar en gran medida la incidencia de las infecciones causadas por CMVH, pero su uso presenta numerosas limitaciones debido a su elevada toxicidad, baja biodisponibilidad y la aparición de numerosas cepas de virus resistentes a los mismos. Por ello, el desarrollo de terapias más efectivas y seguras en este campo continúa siendo una prioridad dentro del área de la investigación antiviral.

En la actualidad se encuentran en etapas avanzadas de estudios en fase clínica los compuestos siguientes: **1.6**³ (CMX001), que es un profármaco de Cidofovir, el derivado de artemisina **1.7**⁴, que se encuentra en estudios clínicos en Fase III y el halobenzoimidazol **1.8**⁵ (Marivabir) que presenta un mecanismo novedoso de acción inhibiendo la proteína quinasa viral UL97 (Figura 1.2).

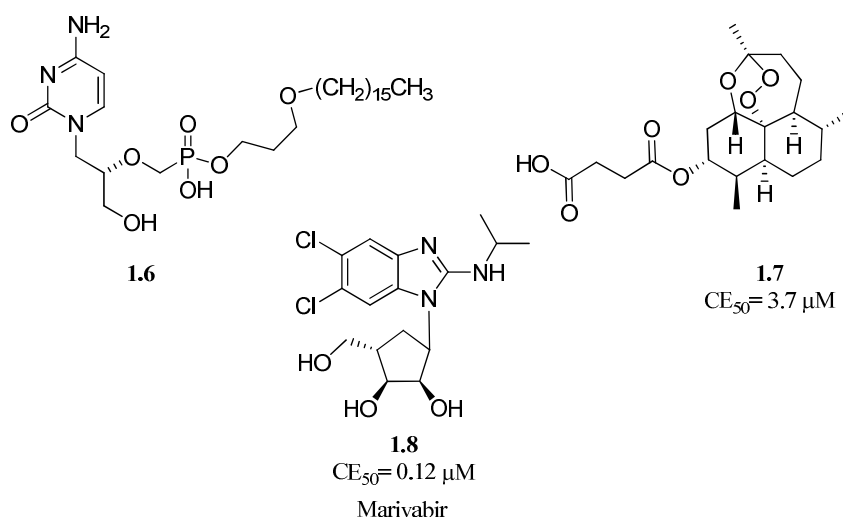


Figura 1.2. Agentes anti-CMVH en estudios clínicos

Además de los compuestos señalados, se han descrito diferentes familias de derivados capaces de inhibir la replicación de CMVH, algunas con mecanismos de acción diferentes a los mencionados, que pueden contribuir a generar nuevos conocimientos sobre el ciclo replicativo de este virus y al descubrimiento de nuevas aproximaciones terapéuticas.

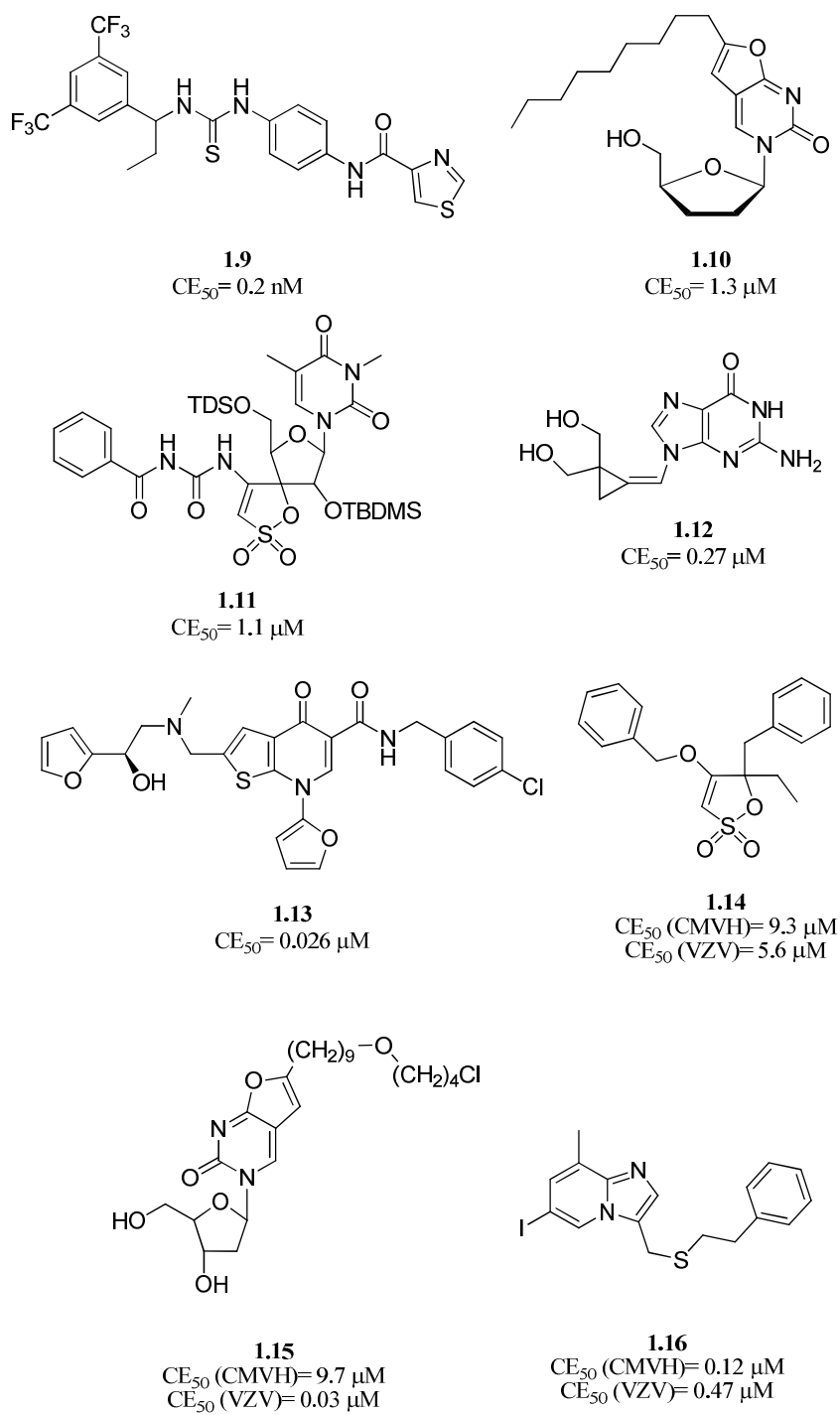


Figura 1.3. Otros agentes anti-CMVH representativos

Entre estos compuestos podemos destacar la tiourea **1.9**^{6,7}, con la actividad anti-CMVH más potente conocida hasta el momento, la familia de pirimidinas **1.10**⁸ y los TSAO-bencilureido derivados **1.11**⁹, así como la familia de metilenciclopropanos, entre los que destaca el compuesto **1.12** (ciclopravir)¹⁰⁻¹³ y la piridincarboxamida **1.13**¹⁴⁻¹⁶ ambos en estudios de fase preclínica (Figura 1.3).

Por otra parte, se han descrito recientemente otras familias de compuestos (**1.14**¹⁷, **1.15**¹⁸ y **1.16**^{19,20}) que actúan como inhibidores duales de CMVH y del virus Varicela Zoster (VZV), también perteneciente a la familia de los virus herpes.

El CMVH, al igual que otros virus herpes, codifica una serina proteasa esencial para la replicación viral, por lo que esta enzima constituye una diana biológica de gran atractivo en la búsqueda de nuevas estrategias anti-CMVH²¹. La proteasa del CMVH juega un papel crítico en el ensamblaje de la cápsida viral y, por tanto, en la maduración e infectividad del virus (Figura 1.4). Desde el punto de vista estructural, esta proteasa es una molécula dimérica con dos sitios activos bien definidos situados en caras opuestas del dímero^{22,23}. Estos sitios activos presentan una triada catalítica única, diferente de otras serina proteasas, constituida por los residuos Ser132, His63 e His157.

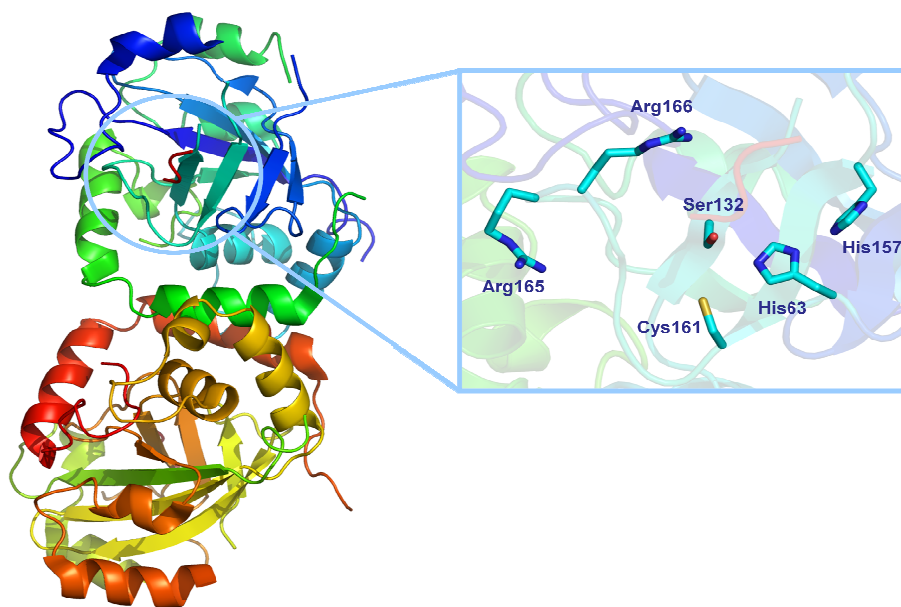


Figura 1.4. Estructura y centro activo de la proteasa de CMVH

La Ser132 es el residuo nucleófilo del centro activo de la proteasa, mientras que la His63 participa como base activando a dicha serina durante el proceso catalítico. Por último, el tercer residuo de la triada, la His157, actúa como ácido, formando un enlace de hidrógeno con la His63. Además, existen otros residuos que parecen jugar un papel importante en el proceso catalítico de la proteasa, como son la Cys161 y las Arg165 y 166. La Cys 161 es un residuo conservado en todas las proteasas de los virus herpes, y se ha descrito que estas enzimas pierden su actividad si la Cys161 se oxida o es modificada por agentes alquilantes²⁴. Por otra parte, estudios de mutagénesis dirigida han puesto de manifiesto que las Arg165 y 166 son claves para la actividad enzimática ya que estabilizan el oxoanión que se forma durante la etapa catalítica²⁵.

El conocimiento de la estructura cristalina de la proteasa del CMVH (1996) y del papel que juega dicha enzima en la replicación viral han potenciado la aparición de diferentes familias de compuestos, inhibidores *in vitro* de esta proteasa (Figura 1.5)²⁶⁻³⁸. La mayoría de estos compuestos inhiben la enzima de forma irreversible mediante un mecanismo que comienza por la acilación del grupo hidroxilo del residuo catalítico de Ser132. Además, estos compuestos presentan en general una toxicidad muy elevada, posiblemente consecuencia de su gran reactividad.

Los primeros inhibidores de la proteasa de CMVH descritos son de naturaleza peptídica y su diseño estuvo basado en la estructura del sustrato, como la pentafluoroetilcetona **1.17**²⁶⁻²⁸. Posteriormente la mayoría de inhibidores desarrollados poseen estructura no peptídica, principalmente derivados de diferentes sistemas heterocíclicos. Entre ellos cabe destacar una serie de tienooxazinonas **1.18**^{29,30}, que inhiben de forma potente la proteasa del virus a través de un mecanismo dual que implica la acilación de la Ser132 y la alquilación simultánea de la Cys161. La elevada presencia de residuos de Cys libre en la enzima se ha explotado también en la preparación de las naftoquinonas **1.19**³¹, que se unen de un modo irreversible a la enzima a través de la Cys202. Borthwick *et al.* han descrito una familia de inhibidores de la proteasa de CMVH tomando como esqueleto base la estructura de α -metil-5,5-*trans*-lactama, representada por el compuesto **1.20**³²⁻³⁶. Por último, cabe destacar el aceptor de Michael **1.21**³⁷ y el derivado de 1,6-naftaleno **1.22**³⁸.

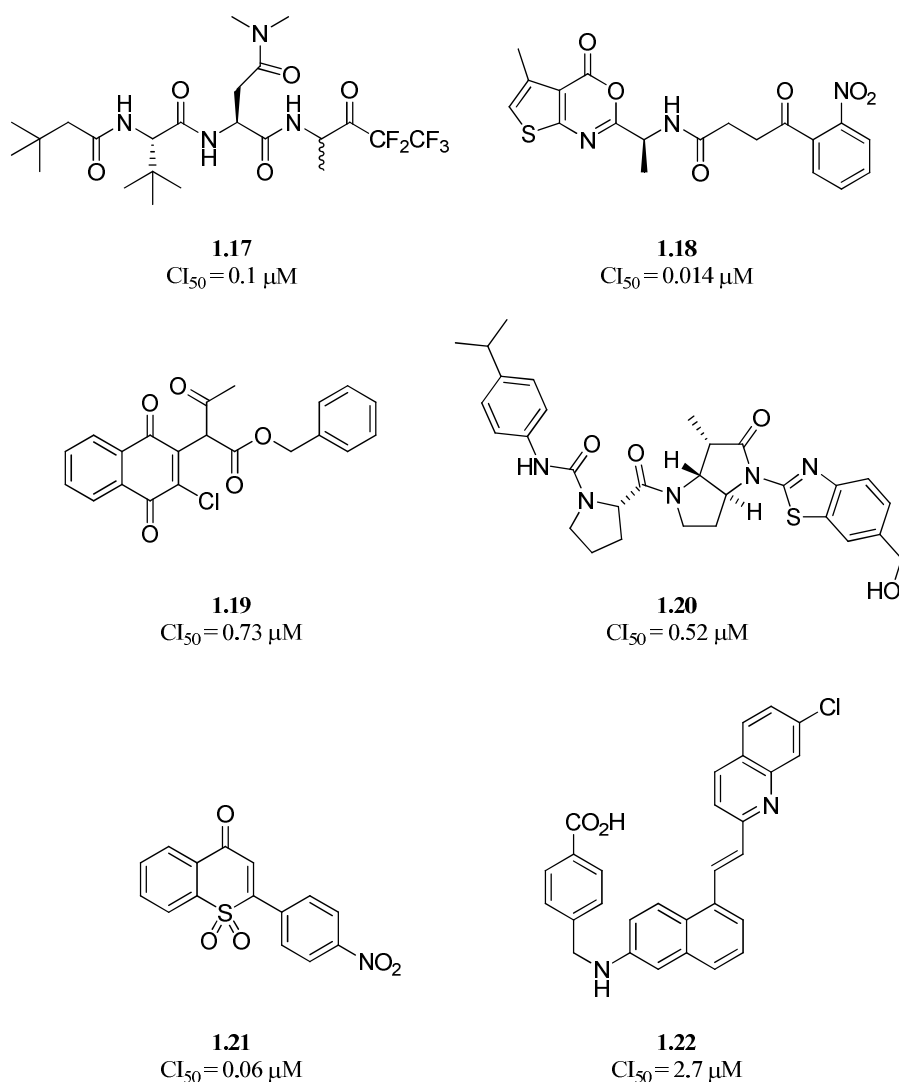


Figura 1.5: Inhibidores de la serina proteasa de CMVH
(Cl_{50} , actividad en la enzima aislada)

El esqueleto monocíclico de β -lactama ha sido uno de los motivos estructurales más empleados en el diseño de inhibidores de serina proteasas, como la trombina³⁹, la leucocito elastasa humana^{40,41} o el antígeno específico de próstata⁴². Dada la similitud estructural de estas proteasas con la serina proteasa de CMVH, era lógico pensar que el anillo de β -lactama pudiera servir como esqueleto base para el desarrollo de inhibidores de la proteasa viral⁴³⁻⁴⁸. En 1998 Déziel *et al.* describieron una serie de inhibidores β -

lactámicos de la proteasa del CMVH⁴⁴. A partir de una serie de híbridos β -lactama-péptido, entre los que destaca el compuesto **1.23** como uno de los inhibidores más potentes, estos investigadores fueron disminuyendo el tamaño y carácter peptídico de esta familia de compuestos hasta llegar a una serie de β -lactamas no peptídicas de bajo peso molecular (Compuestos **1.24-1.26**, Fig. 1.6)⁴⁴⁻⁴⁸.

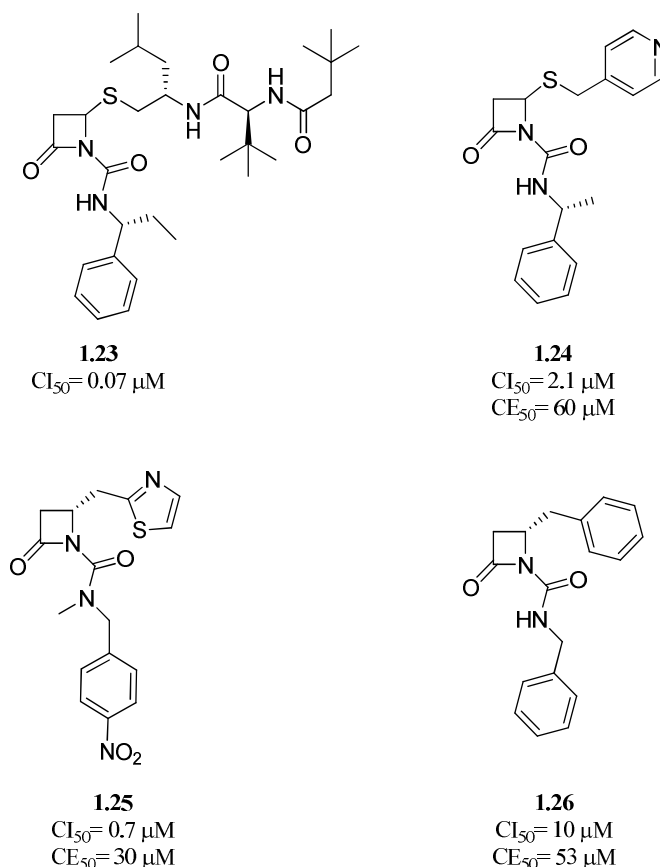


Figura 1.6. Principales inhibidores β -lactámicos de la serina proteasa de CMVH
(CI₅₀, inhibición de la enzima aislada; CE₅₀, actividad en cultivo celular)

A partir de los estudios de relaciones estructura-actividad llevados a cabo en esta familia de inhibidores se puede deducir que: *a*) es necesaria la acilación en posición 1 de la β -lactama, *b*) existe una cierta preferencia por grupos bencilo o análogos heterocíclicos en posición 4, *c*) la presencia de sustituyentes en posición 3, aunque en algunos casos mejora la actividad frente a la enzima aislada, supone una pérdida importante de selectividad frente a otras proteasas.

Los compuestos recogidos en la Figura 1.6 son ejemplo de inhibidores potentes de la proteasa de CMVH en ensayos *in vitro* (CI₅₀). Sin embargo, en ensayos de inhibición de la replicación viral en cultivos celulares (CE₅₀) estos derivados son mucho menos efectivos de lo que cabría esperar en base al valor de inhibición obtenido en el ensayo con la enzima aislada. Esta importante pérdida de potencia se ha atribuido a problemas en el paso a través de la membrana celular y/o a la degradación de dichos compuestos en el medio en que se lleva a cabo el ensayo⁴⁵. Sin embargo, el hecho de que diferentes derivados β -lactámicos, inhibidores de la leucocito elastasa humana^{40,41}, posean una alta biodisponibilidad oral deja abierto el camino a una posible inhibición de la serina proteasa de CMVH con compuestos β -lactámicos con mejor perfil farmacológico.

1.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Con objeto de intentar mejorar la actividad *in vivo* de los derivados β -lactámicos descritos anteriormente, en nuestro grupo de investigación se habían preparado y evaluado una serie de azetidinonas de fórmula general **I** (Fig. 1.7), que incorporaban una doble sustitución en posición 4, y presentaban un grupo carboxilato adicional con respecto al análogo **1.26** tomado como modelo^{49,50}. Dicho grupo podría participar en el proceso de reconocimiento de la enzima y por tanto en la inhibición de la actividad catalítica de la misma, pudiendo ser particularmente adecuado para interactuar con el grupo guanidinio de los residuos de Arg165 y/o Arg166^{22,23}.

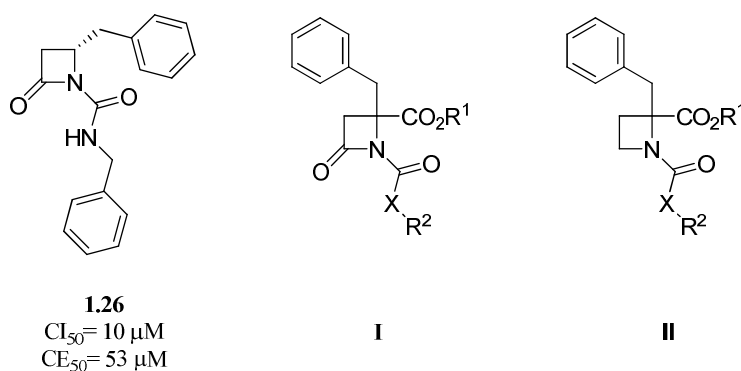


Figura 1.7. Azetidinonas y azetidinas diseñadas como potenciales inhibidores de la proteasa de CMVH

Por otra parte, en base a estrategias seguidas para la preparación de inhibidores *no covalentes* de serina proteasas de mamíferos^{51,52}, el grupo también llevó a cabo la síntesis y evaluación biológica de una serie de azetidinas de fórmula general **II**, análogas de los compuestos **I** (Fig. 1.7)⁵⁰. Esta estrategia, consistente en la eliminación en los inhibidores covalentes del grupo encargado de acilar el residuo de Ser, había conducido a derivados potentes y selectivos en el caso de la trombina⁵¹. Teniendo en cuenta estos precedentes, razonamos que si los compuestos **I** fueran capaces de acomodarse en el centro activo de la proteasa de CMVH, como lo hacen su análogo **1.26**, cabría esperar que las azetidinas **II**, a pesar de carecer del grupo acilante, podrían acceder también al centro activo y, por lo tanto, proporcionar algún inhibidor *no covalente* de la proteasa del CMVH. Esta hipótesis de trabajo pareció confirmarse ya que se obtuvieron inhibidores de la replicación viral del CMVH, tanto en la serie de las β -lactamas **I** como en la de las

azetidinas **II**^{49,50}. Dentro de la serie de las azetidinas, los mejores resultados se lograron con los compuestos **1.27-1.29** (Fig.1.8). El *terc*-butoxicarbonil derivado **1.27** resultó ser el compuesto con mayor actividad anti-CMVH, aunque presentó una citotoxicidad muy elevada. Los derivados dipeptídicos **1.28** y **1.29** mostraron valores mayores de CE₅₀, pero su citotoxicidad fue ligeramente menor.

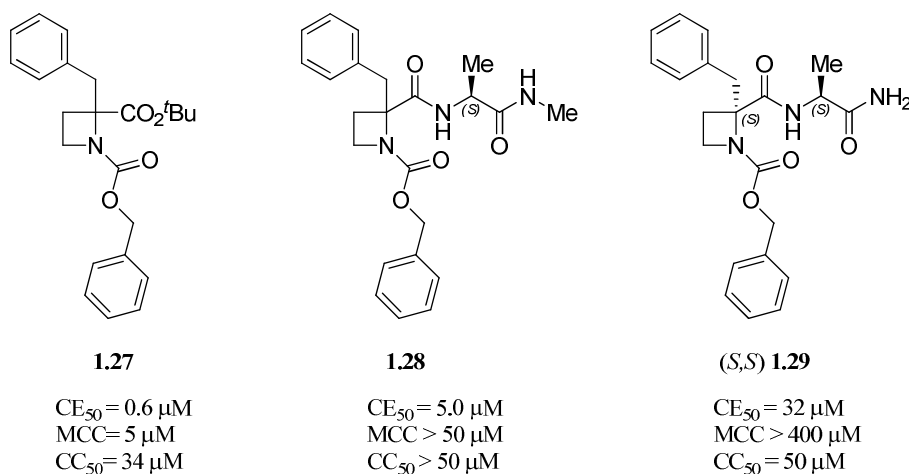


Figura 1.8. Derivados azetidínicos con mejor actividad biológica

A partir de los datos biológicos obtenidos para la familia de azetidinas **II** se pudieron establecer algunas conclusiones respecto a la relación entre su estructura y actividad. Se observó que en posición 1 del anillo de azetidina es necesaria la presencia de un grupo aromático, preferentemente de tipo bencilo. La presencia de ésteres metílicos o ácidos carboxílicos en posición 2 dió lugar a análogos inactivos. Comparando la actividad de **1.27** y **1.28** con **1.29**, se comprueba que un cierto aumento de hidrofobicidad en el grupo 2-carboxilato o en el residuo de carboxamida en posición C-terminal conlleva una mejora en la actividad antiviral. Se podría pensar, por tanto, que la sustitución del residuo de Ala por aminoácidos más hidrofóbicos, así como la incorporación de grupos alifáticos en el nitrógeno amídico en C-terminal podría también mejorar la actividad.

CE₅₀: Concentración inhibitoria requerida para reducir la formación del virus en un 50%.

MCC: Concentración citotóxica mínima que causa una alteración microscópicamente detectable de la morfología celular.

CC₅₀: Concentración citotóxica mínima requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%.

1.3. OBJETIVOS

En base a los resultados obtenidos en la familia de azetidinas inhibitoras de CMVH y con el objetivo de intentar conseguir compuestos más potentes y seguros, se inició un programa de preparación de compuestos estructuralmente relacionados (Figura 1.9). Seleccionando el compuesto **1.29** como modelo, este capítulo contempla la síntesis y la evaluación antiviral de tres series de análogos estructurales (**A-C**). En primer lugar, los derivados de la serie **A**, incorporan grupos voluminosos tanto alifáticos como aromáticos en el nitrógeno amídico en C-terminal. En segundo lugar, en los compuestos de la serie **B**, el residuo de Ala se ha sustituido por diversos aminoácidos alifáticos, aromáticos y polares. También se ha contemplado la incorporación de D-Ala para evaluar la influencia de la configuración del residuo C-terminal en la actividad antiviral. Por último, en la tercera serie de análogos (serie **C**), se ha sustituido el grupo benciloxicarbonilo unido al nitrógeno azetidínico por otros agrupamientos aromáticos de tipo uretano, y por diferentes grupos acilo, urea y sulfonilo.

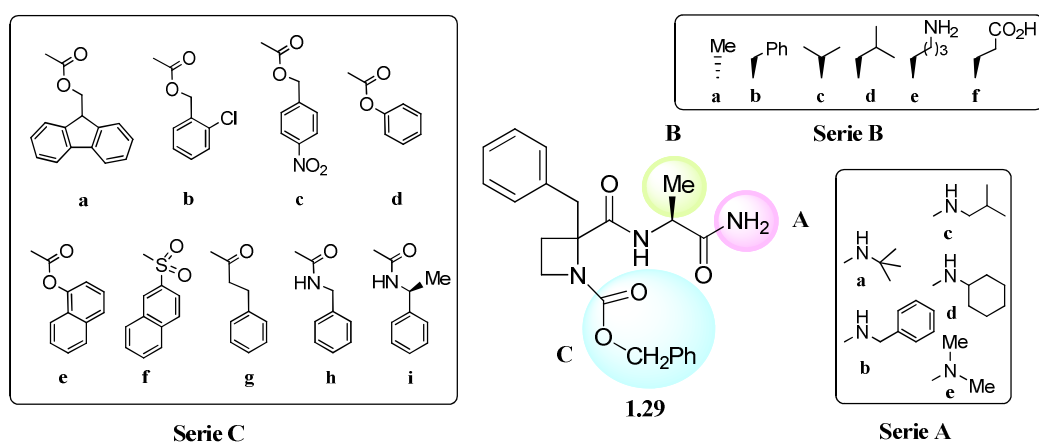


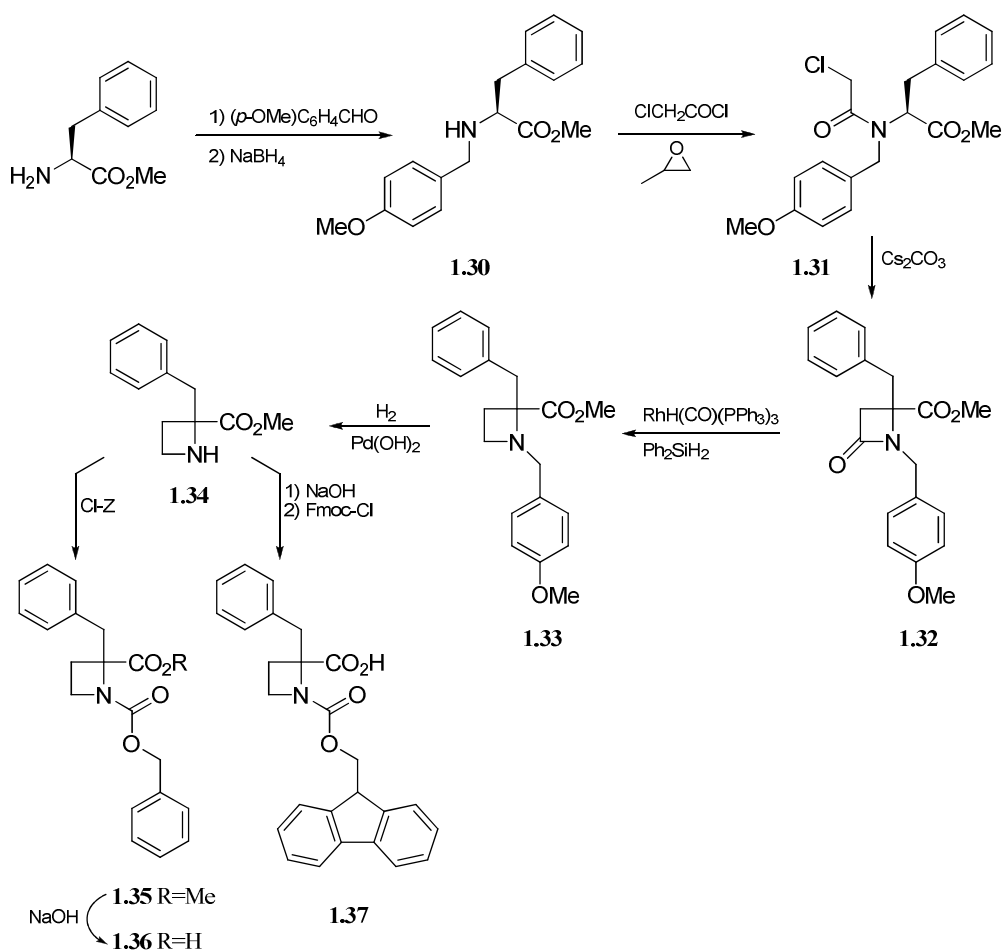
Figura 1.9. Derivados azetidínicos objetivo de este capítulo

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Síntesis

1.4.1.1. Síntesis de azetidinas precursoras

Las azetidinas 2,2-disustituidas, requeridas como producto de partida para la obtención de los compuestos objetivo, se prepararon siguiendo un procedimiento sintético puesto a punto en nuestro grupo de trabajo para la síntesis de 2-alkil-2-carboxi-2-azetidinas a partir de aminoácidos^{53,54} y su transformación posterior en las correspondientes azetidinas⁵⁷, como se indica en el Esquema 1.1.



Esquema 1.1

El primer paso de la secuencia sintética fue la preparación del N - p -metoxibencil derivado **1.30** a partir de H-Phe-OMe mediante un proceso de aminación reductora. La

reacción de estos derivados con cloruro de cloroacetilo, en presencia de óxido de propileno como captador de hidrácido, dio lugar al derivado cloroacetilado **1.31** con rendimiento prácticamente cuantitativo. Es de resaltar que en el espectro de ^1H RMN de **1.31**, los protones en posición α -Phe y $N\text{-CH}_2$ aparecen notablemente desapantallados en comparación con esos mismos protones en el derivado **1.30**. Además, se observa un multiplete a 4.06 ppm correspondiente a los protones del grupo $\text{CH}_2\text{-Cl}$. En el espectro de ^{13}C RMN aparece un nuevo carbono carbonílico en torno a 168 ppm, correspondiente al del grupo amida generado. La ciclación intramolecular del derivado **1.31** utilizando Cs_2CO_3 como base en CH_3CN , condujo a la β -lactama **1.32** con buen rendimiento. La desaparición del protón α -Phe en el espectro de ^1H RMN, junto a la aparición de una señal de carbono cuaternario en torno a 60 ppm en el de ^{13}C RMN, fueron indicativos de la formación del anillo de azetidinona. Es de señalar que aunque en este proceso se parte de un aminoácido ópticamente activo, la formación del anillo de β -lactama debe proceder a través de un enolato intermedio, en el que se destruye el centro estereogénico del aminoácido de partida, lo que debería conducir a la formación del derivado **1.32** como mezcla racémica. Sin embargo, para aminoácidos con cadena lateral ramificada (Phe, Trp, Leu, Val, Asp), la ciclación debe transcurrir a través de un enolato plano con quiralidad axial, en base al concepto de memoria de quiralidad, que conlleva una moderada enantioselectividad hacia el isómero $4S$, de acuerdo con estudios anteriores del grupo^{55,56}. En el caso particular de la ciclación del derivado **1.31**, la selectividad observada hacia la β -lactama **1.32** de configuración $4S$, frente a la $4R$, fue de 2:1.

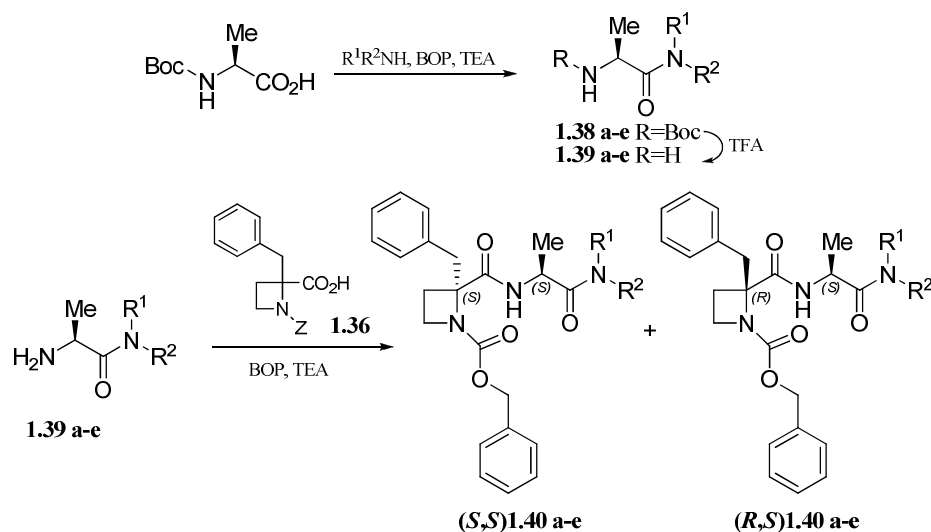
Una vez preparada la azetidinona **1.32**, el siguiente paso de la ruta sintética fue su reducción quimioselectiva utilizando Ph_2SiH_2 y $\text{RhH(CO)(PPh}_3)_3$ como catalizador⁵⁷, obteniéndose de este modo la azetidina **1.33** (88 %). La eliminación del grupo *p*-metoxibencilo del compuestos **1.33** mediante hidrogenación catalítica, utilizando Pd(OH)_2 como catalizador y un equivalente de HCl , proporcionó el derivado **1.34**. La introducción del grupo benciloxycarbonilo (*Z*) sobre el NH libre del compuesto **1.34**, dio lugar a la azetidina **1.35**⁵⁸. Finalmente la saponificación del éster metílico condujo al compuesto 2(*R,S*)-2-bencil-1-benciloxycarbonil-2-carboxiazetidina (**1.36**), que será empleado posteriormente como precursor de los compuestos de las series **A** y **B**. El (9-fluorenil)metoxycarbonil derivado **1.37**, utilizado como precursor de los compuestos de la

serie **C**, se obtuvo mediante la saponificación del éster metílico del compuesto **1.34** seguido de la introducción del grupo Fmoc sobre el nitrógeno azetidínico.

1.4.2. Síntesis de derivados modificados en el grupo amida (serie A)

La primera serie de análogos estructurales del compuesto **1.29** contempla la introducción de diferentes grupos alifáticos y aromáticos en el grupo amida en posición C-terminal de esta familia de derivados dipeptídicos.

En primer lugar se obtuvieron las correspondientes amidas partiendo del derivado del aminoácido Ala. Para ello, se llevó a cabo la reacción entre Boc-Ala-OH y las aminas seleccionadas, utilizando BOP como agente de acoplamiento y TEA como base, dando así lugar a las amidas **1.38a-e** con buenos rendimientos. A continuación, la eliminación del grupo *tert*-butoxicarbonilo con ácido trifluoroacético, proporcionó los derivados H-Ala-NR¹R² **1.39a-e** con rendimiento cuantitativo.



Compuesto	R ¹	R ²
1.38a, 1.39a, 1.40a	C(CH ₃) ₃	H
1.38b, 1.39b, 1.40b	CH ₂ Ph	H
1.38c, 1.39c, 1.40c	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H
1.38d, 1.39d, 1.40d	Chx	H
1.38e, 1.39e, 1.40e	CH ₃	CH ₃

Esquema 1.2

Finalmente, el acoplamiento de la azetidina **1.36** con cada uno de los derivados de H-Ala-NR¹R², utilizando BOP como agente de acoplamiento y TEA como base, condujo a los compuestos objetivo de la serie **A** (**1.40a-e**) con buenos rendimientos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Derivados de la Serie A

Compuesto	R ¹	R ²	Proporción (R,S):(S,S) ^a	Rdto (%) ^b
1.40a	C(CH ₃) ₃	H	30:70	83
1.40b	CH ₂ Ph	H	32:68	82
1.40c	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	29:71	85
1.40d	Chx	H	31:69	75
1.40e	CH ₃	CH ₃	33:67	95

^aDeterminada por HPLC en los crudos de reacción.

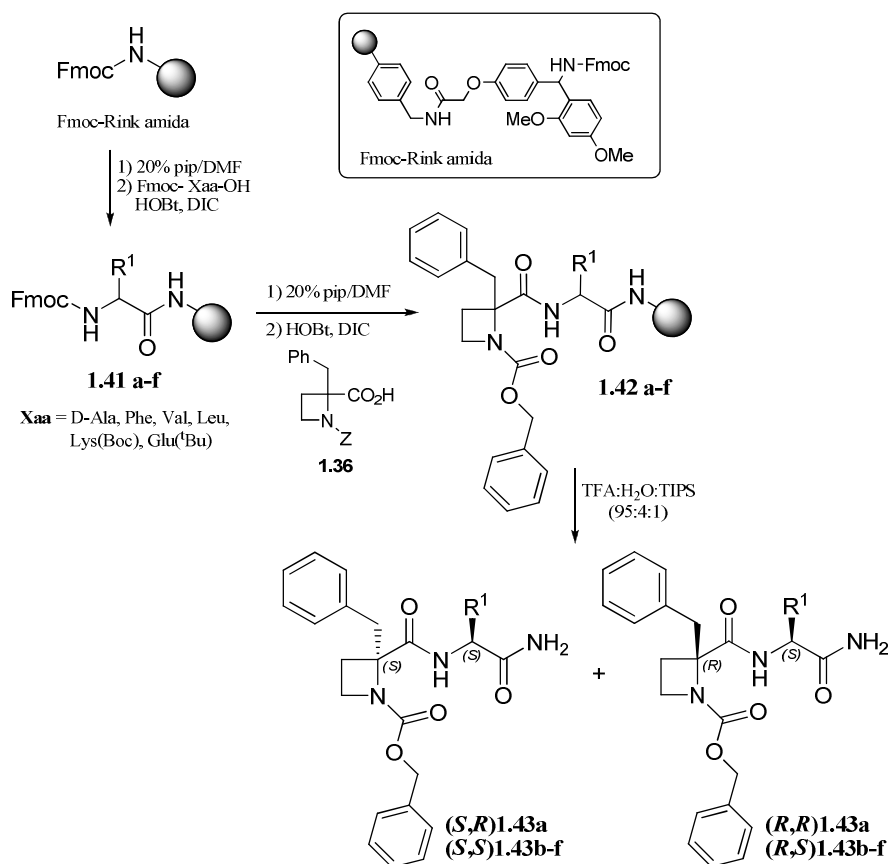
^bRendimiento de producto aislado (mezcla de diastereoisómeros).

Cada uno de los productos finales **1.40a-e** se obtuvo como una mezcla de dos diastereoisómeros que pudieron resolverse mediante cromatografía en columna. Puesto que la azetidina **1.36** es una mezcla de enantiómeros *S*:*R* en proporción aproximada 2:1, a los compuestos mayoritarios en las mezclas de diastereoisómeros se les asignó configuración *2S*.

En los espectros de ¹H RMN de estos derivados se observó la aparición de las señales características del aminoácido Ala, como son el α-H y el grupo metilo, en torno a 4.5 y 1.4 ppm, respectivamente, así como el doblete del grupo amida α-NH en torno a 8.3 ppm. En cada uno de los derivados se observaron las señales características de los diferentes sustituyentes del grupo amida C-terminal. Cabe destacar que todos derivados mostraron rotamería *cis/trans* en torno al enlace uretano en posición 1 de la azetidina, con un porcentaje de rotámero *cis* comprendido entre 11-19%.

1.4.1.3. Síntesis de derivados modificados en la cadena lateral del aminoácido en C-terminal (serie B)

La segunda familia de análogos del compuesto prototipo **1.29** pretende explorar la influencia en la actividad antiviral de la cadena lateral de los aminoácidos en posición C-terminal.



Compuesto	R ^I
1.41a, 1.42a, 1.43a	CH ₃
1.41b, 1.42b, 1.43b	CH ₂ Ph
1.41c, 1.42b, 1.43c	CH(CH ₃) ₂
1.41d, 1.42d, 1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
1.41e, 1.42e / 1.43e	(CH ₂) ₄ NHBoc / (CH ₂) ₄ NH ₂
1.41f, 1.42f / 1.43f	(CH ₂) ₂ CO ₂ ^t Bu / (CH ₂) ₂ CO ₂ H

Esquema 1.3

La síntesis de los derivados objetivo de la serie **B** se realizó siguiendo procedimientos de síntesis en fase sólida con un esquema de protección Fmoc/^tBu. Como matriz polimérica se empleó una resina Fmoc-Rink Amida que permite la obtención de los compuestos con un grupo amida en C-terminal directamente en la etapa del desanclaje.

Como se muestra en el Esquema 1.3, el primer paso de la secuencia sintética fue la eliminación del grupo protector Fmoc de la resina, por tratamiento con piperidina, y la incorporación de los Fmoc-aminoácidos seleccionados D-Ala, Phe, Leu, Val, Lys(Boc) y Glu(^tBu) para dar lugar a las resinas **1.41a-f**. En el caso de Lys y Glu, las cadenas laterales portan grupos protectores ortogonales al Fmoc (Boc y ^tBu, respectivamente). Los acoplamientos se realizaron con HOBt/DIC y el grado de evolución de la reacción se controló mediante el test de Kaiser de aminas primarias.

Tras eliminar el grupo Fmoc de las resinas **1.41a-f**, se realizó el acoplamiento del derivado azetidínico **1.36**, en las condiciones anteriormente señaladas. Una vez completado el acoplamiento, los productos sobre las resinas **1.42a-f** se desanclaron, utilizando el cóctel TFA/H₂O/TIPS (95:4:1), obteniéndose de este modo los derivados modificados de la serie **B**, **1.43a-f**, con buenos rendimientos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Derivados de la Serie **B**

Compuesto	R ¹	Proporción (R,S):(S,S) ^a	Rdto (%) ^b
1.43a	CH ₃	25:75	93
1.43b	CH ₂ Ph	30:70	97
1.43c	CH(CH ₃) ₂	28:72	86
1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	31:69	88
1.43e	(CH ₂) ₄ NH ₂	26:74	93
1.43f	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	27:73	94

^aDeterminada por HPLC en los crudos de reacción.

^bRendimiento de producto aislado (mezcla de diastereoisómeros).

Al igual que en la serie anterior, cada uno de los compuestos finales se obtuvo como una mezcla de dos diastereoisómeros que pudieron separarse mediante cromatografía en columna, con excepción de los derivados de Lys y Glu (**1.43e** y **1.43f**).

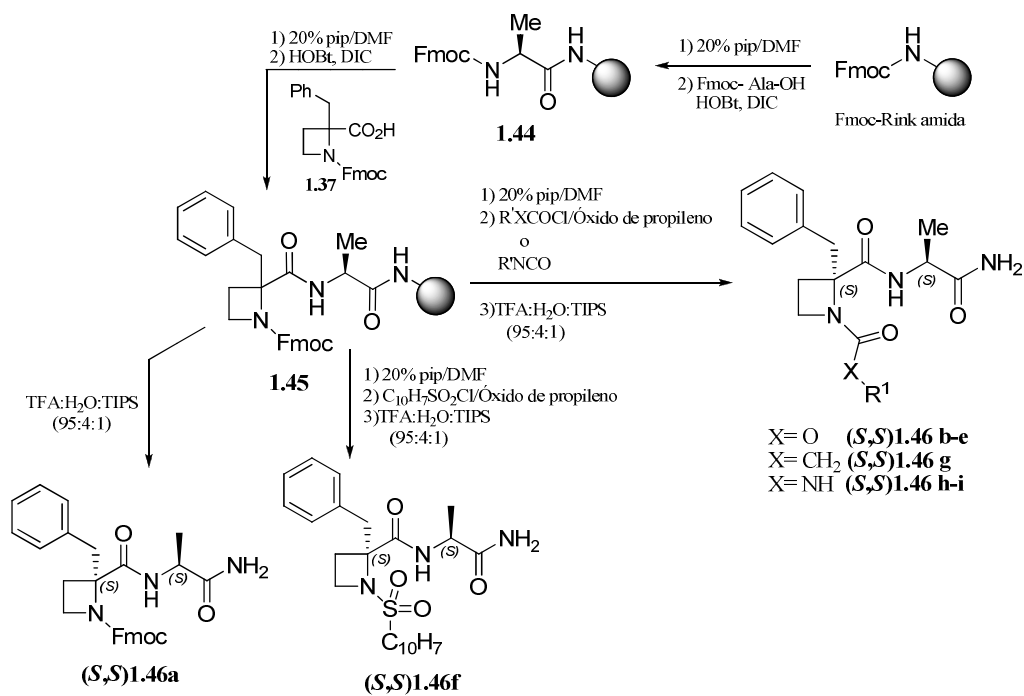
En los espectros de ^1H RMN de todos los derivados se observó el doblete característico del protón del grupo amida secundaria en torno a 8.2 ppm, así como los dos singletes anchos debidos a los dos protones del grupo CONH_2 en C-terminal. Cada uno de los compuestos mostró las señales características de las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos incorporados en posición C-terminal. En los espectros se observó además rotamería *cis/trans* en torno al enlace uretano en posición 1 de la azetidina, con un porcentaje de rotámero *cis* comprendido entre 11-18%.

1.4.1.4. Síntesis de derivados con diferentes sustituyentes en el nitrógeno azetidínico (serie C)

La tercera y última familia de análogos estructurales diseñada está basada en la incorporación de diferentes grupos de naturaleza aromática en el nitrógeno azetidínico, sustituyendo al grupo benciloxycarbonilo presente en el prototipo de partida.

La preparación de los compuestos de esta serie se llevó a cabo mediante metodología de síntesis en fase sólida, siguiendo un procedimiento paralelo al explicado anteriormente para la obtención de los análogos de la serie B.

La ruta sintética, recogida en el Esquema 1.4, comenzó con la eliminación del grupo protector Fmoc de la resina Rink Amida y la incorporación del aminoácido seleccionado, Fmoc-Ala-OH, dando así lugar a la resina **1.44**. El acoplamiento se realizó con HOBt/DIC y la finalización de la reacción se controló mediante el test de Kaiser de aminas primarias. Tras eliminar el grupo Fmoc de la resina **1.44**, se realizó una reacción de acoplamiento con el derivado azetidínico **1.37**, portador de un grupo Fmoc en el nitrógeno de la azetidina. El test de Kaiser de aminas primarias resultó positivo tras el primer acoplamiento, por lo que se decidió repetir la reacción en idénticas condiciones. Tras este segundo intento, este test colorimétrico indicó que aunque se había producido un gran avance en la reacción, esta no se había completado, ya que se observaban pequeñas trazas de la resina con una ligera coloración azul, indicativa de la presencia residual de aminas primarias. Para evitar la interferencia de estos grupos amina libres del residuo de Ala en la siguiente etapa de la ruta sintética, se procedió a su acetilación mediante tratamiento con anhídrido acético en medio básico. Finalmente, el test de Kaiser resultó negativo indicando así la desaparición de todos los grupos amina primaria.



Compuesto final	Reactivo	Sustituyente en N
1.46a	---	
1.46b	ClC ₆ H ₄ CH ₂ OCOC	
1.46c	NO ₂ C ₆ H ₄ CH ₂ OCOC	
1.46d	C ₆ H ₅ OCOC	
1.46e	C ₁₀ H ₇ OCOC	
1.46f	C ₁₀ H ₇ SO ₂ Cl	
1.46g	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ COC	
1.46h	C ₆ H ₅ CH ₂ NCO	
1.46i	C ₆ H ₅ CH(CH ₃)NCO	

Esquema 1.4

La resina obtenida, **1.45**, se dividió en nueve porciones iguales. Una de estas porciones se sometió a las condiciones de desanclaje anteriormente señaladas, dando lugar así al Fmoc-derivado **1.46a**. Sobre cada una de las restantes porciones de la resina **1.45**, se realizó la incorporación de los grupos acilo o sulfonilo seleccionados, previa desprotección del grupo Fmoc. La evolución de estas reacciones se controló mediante el test de cloranilo de aminas secundarias. Finalmente, tras el desanclaje en medio ácido (TFA:H₂O:TIPS), se obtuvieron los restantes compuestos de la serie C, **1.46b-i**.

En esta serie los crudos obtenidos de los productos finales fueron más sucios que en los compuestos de la serie B y los rendimientos más bajos, probablemente a causa del acoplamiento incompleto del Fmoc derivado **1.37** sobre la resina, como se comentó anteriormente. Debido a un menor grado de pureza de los crudos de reacción, la purificación de estos derivados mediante cromatografía en columna resultó ser mucho más dificultosa que en las series anteriores. De hecho, solo pudieron ser aislados en forma pura los diastereoisómeros mayoritarios, de configuración *S,S*.

Tabla 1.3. Derivados de la Serie C

Compuesto	Sustituyente en N	Proporción (<i>R,S</i>):(<i>S,S</i>) ^a	Rdto (%) ^b
1.46a	Fmoc	30:70	55
1.46b	CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ Cl	32:68	41
1.46c	CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂	31:69	54
1.46d	CO ₂ C ₆ H ₅	28:72	74
1.46e	CO ₂ C ₁₀ H ₇	30:70	72
1.46f	SO ₂ C ₁₀ H ₇	29:71	62
1.46g	CO(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	31:69	48
1.46h	CONHCH ₂ C ₆ H ₅	28:72	64
1.46i	CONHCH(CH ₃)C ₆ H ₅	30:70	55

^aDeterminada por HPLC en los crudos de reacción.

^bRendimiento de producto aislado (mezcla de diastereoisómeros).

En los espectros de ¹H RMN de estos derivados, además de los protones característicos del residuo de 2-bencilazetidina, se observaron las señales características del aminoácido Ala, como son el α-H y el grupo metilo, en torno a 4.5 y 1.4 ppm respectivamente, así como el doblete del grupo α-NH Ala, en torno a 8.4 ppm, y los dos

singletes anchos del grupo CONH₂. En cada uno de los derivados se observaron las señales características de los diferentes sustituyentes en el nitrógeno azetidínico.

Al igual que en los anteriores derivados, con excepción del compuesto **1.46f**, en los espectros de estos derivados se observó rotamería *cis/trans* en torno al enlace CON en posición 1 de la azetidina, con un porcentaje de rotámero *cis* comprendido entre 8-17%.

1.4.2. Estudios conformacionales por RMN

Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo la evaluación de la capacidad de 2-alkil-2-carboxiazetidinas derivadas de aminoácidos para inducir giros inversos, estructuras secundarias frecuentes en péptidos, tras ser insertadas en modelos peptídicos⁵⁹⁻⁶¹. Estos estudios, basados en datos espectroscópicos y de modelización molecular han permitido concluir que estos aminoácidos conformacionalmente restringidos son buenos inductores de giros γ . Por una parte, son capaces de reproducir la topografía de estos giros, a la vez que permiten la incorporación de cadenas laterales de aminoácidos sobre el anillo de azetidina, y por otra, poseen grupos NH_2 y CO_2H que los hacen adecuados para su inserción en cadenas peptídicas.

Teniendo en cuenta estos precedentes, se consideró de interés realizar un estudio conformacional en disolución de los derivados azetidínicos preparados en este trabajo para comprobar si eran capaces o no de adoptar conformaciones de giro γ , y si la actividad biológica podría estar relacionada con algún aspecto conformacional concreto.

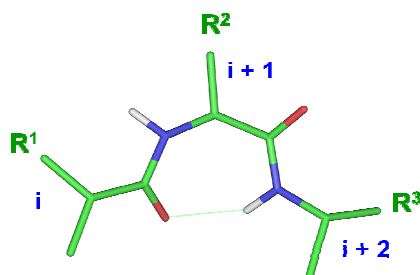
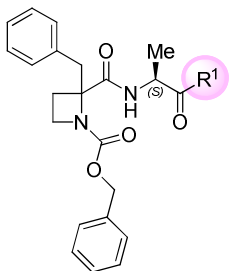
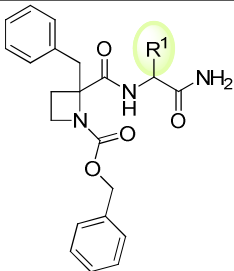
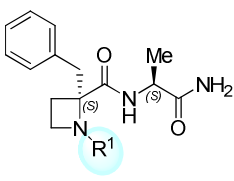


Figura 1.10. Estructura de un giro γ

Los giros γ están formados por tres residuos consecutivos de aminoácidos formando un pseudociclo de siete miembros, estabilizados en general por la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo carbonilo del primer residuo (i) y el NH del tercero (i+2) (Figura 1.10). Está descrito que, en péptidos pequeños, valores de desplazamiento químico superiores a 7 ppm en CDCl_3 , junto a pequeñas variaciones al cambiar a DMSO, son indicativos de que un protón amida podría estar implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular^{62,63}. Otro dato experimental que da idea de un enlace de hidrógeno intramolecular en péptidos es el coeficiente de temperatura de los protones amida del péptido. En DMSO, valores de coeficientes $\Delta\delta/\Delta T$ menores o iguales a 3 ppb/K (en valor absoluto) indican que el protón NH está protegido y no es accesible al disolvente^{62,63}. En péptidos de pequeño tamaño, este dato refleja la presencia de enlaces

de hidrógeno intramoleculares. Por el contrario, valores superiores a 4 ppb/K muestran accesibilidad del disolvente al NH, descartando la existencia de este tipo de enlace, mientras que valores en el intervalo de 3-4 ppb/K se encuentran en el rango de incertidumbre que no permite extraer conclusiones.

Tabla 1.4. Desplazamientos químicos para los protones amida de los derivados azetidínicos **1.40a-e**, **1.43a-d**, **1.46a-i**.

Serie	Compuesto	R ¹	δ α-NH ^{a,b}		δ CONH ^{a,c}	
			CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO
 A	(S,S)- 1.40a	NHC(CH ₃) ₃	8.29	8.20	6.26	7.79
	(R,S)- 1.40a	NHC(CH ₃) ₃	8.14	8.04	6.15	7.81
	(S,S)- 1.40b	NHCH ₂ Ph	8.29	8.31	6.82	8.41
	(R,S)- 1.40b	NHCH ₂ Ph	8.29	8.17	6.76	8.47
	(S,S)- 1.40c	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	8.27	8.29	6.51	7.84
	(S,S)- 1.40d	NHChx	8.23	8.24	6.36	7.79
	(R,S)- 1.40d	NHChx	8.20	8.10	6.25	7.79
	(S,S)- 1.40e	N(CH ₃) ₂	8.67	8.26	--	--
	(R,S)- 1.40e	N(CH ₃) ₂	8.43	8.22	--	--
 B	(S,R)- 1.43a	CH ₃	8.28	8.06	6.29, 5.28	7.05
	(R,R)- 1.43a	CH ₃	8.23	8.21	6.42, 5.30	7.33, 7.09
	(S,S)- 1.43b	CH ₂ Ph	7.88	8.17	6.16, 5.30	7.41
	(R,S)- 1.43b	CH ₂ Ph	8.43	8.06	6.24, 6.10	7.52
	(S,S)- 1.43c	CH(CH ₃) ₂	8.19	8.09	6.16, 5.43	7.15
	(R,S)- 1.43c	CH(CH ₃) ₂	8.41	7.88	6.12, 6.01	7.48, 7.07
	(S,S)- 1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	8.03	8.17	6.34, 5.37	7.06
	(R,S)- 1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	8.16	7.94	6.24, 5.50	6.99
 C	(S,S)- 1.46a	Fmoc	8.23	8.17	6.39, 5.35	7.08
	(S,S)- 1.46b	2-ClC ₆ H ₄ CH ₂ OCO	8.21	8.19	6.39, 5.27	7.21, 7.12
	(S,S)- 1.46c	4-NO ₂ C ₆ H ₄ CH ₂ OCO	8.19	8.16	6.29, 5.31	7.33, 7.09
	(S,S)- 1.46d	C ₆ H ₅ OCO	8.11	8.18	6.33, 5.32	7.09
	(S,S)- 1.46e	1-C ₁₀ H ₇ OCO	8.18	8.16	6.30, 5.29	7.31
	(S,S)- 1.46f	2-C ₁₀ H ₇ SO ₂	8.44	8.51	6.22, 5.24	7.41, 7.12
	(S,S)- 1.46g	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ CO	8.82	8.67	6.43, 5.31	7.33, 7.05
	(S,S)- 1.46h	C ₆ H ₅ CH ₂ NHCO	8.85	8.89	6.63, 5.41	7.04
	(S,S)- 1.46i	C ₆ H ₅ CH ₂ (CH ₃)NHCO	8.04	8.12	6.60, 5.34	7.06

^a Valores en ppm. ^b NH del enlace peptídico. ^c CONH (serie A), CONH₂ (series B y C) C-terminales.

En la Tabla 1.4 se recogen los valores de los desplazamientos químicos en CDCl_3 y DMSO de los dos tipos de protones amida presentes en los compuestos preparados. En el caso de los protones amida del enlace peptídico, todos los desplazamientos químicos en CDCl_3 se sitúan en un rango entre 7.88 y 8.85 ppm, y las diferencias al pasar a DMSO son inferiores a 0.2 ppm en la gran mayoría de los derivados. Estos datos parecen sugerir que dicho protón podría formar parte de un enlace de hidrógeno intramolecular. Por otra parte, los desplazamientos químicos en CDCl_3 para los protones del grupo amida en C-terminal son en todos los casos claramente inferiores a 7 ppm (rango 5.14-6.82 ppm) y las diferencias al pasar a DMSO superan en la mayoría de los compuestos 1 ppm. En base a estos resultados un enlace de hidrógeno en esta posición sería mucho menos probable.

En los estudios de variación del desplazamiento químico de los protones amida con la temperatura, se utilizó DMSO-d_6 como disolvente. Al igual que en los espectros registrados en CDCl_3 , se observó en todos rotamería *cis/trans* en torno al enlace CON en posición 1 de la azetidina, aunque con porcentajes de rotámeros *cis* superiores (11-40%). Se registraron espectros entre 30 y 60 °C a intervalos de 10 °C y se calcularon los coeficientes de temperatura para los distintos protones NH de los rotámeros *trans* mayoritarios. En la figura 1.11 se muestra, a modo de ejemplo, la representación gráfica de los resultados obtenidos para el derivado (*R,S*)-**1.43c**. Los coeficientes de temperatura se obtienen del valor de las pendientes de las rectas resultantes de representar la variación de los desplazamientos químicos frente a la temperatura.

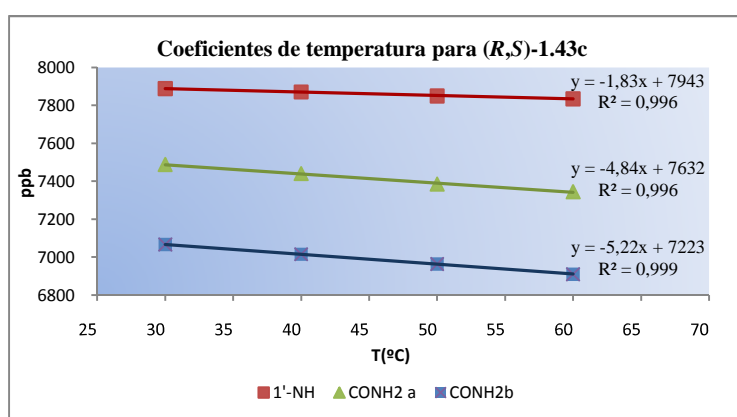
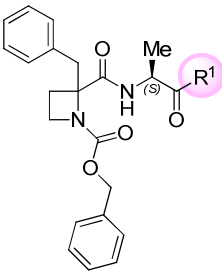
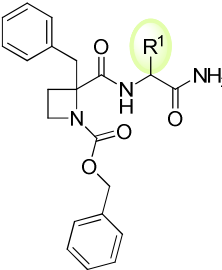
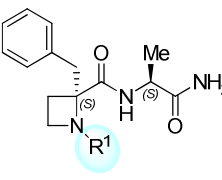


Figura 1.11. Cálculo de los coeficientes de temperatura para (*R,S*)-**1.43c**

Tabla 1.5. Coeficientes de temperatura para los protones amida de los derivados azetidínicos **1.40a-e**, **1.43a-d**, **1.46a-i**.

Serie	Compuesto	R ¹	$\Delta\delta/\Delta T$ α -NH ^{a,b}	$\Delta\delta/\Delta T$ CONH ^{a,c}
 <p>A</p>	(S,S)- 1.40a	NHC(CH ₃) ₃	-2.5	-3.5
	(R,S)- 1.40a	NHC(CH ₃) ₃	-2.0	-4.0
	(S,S)- 1.40b	NHCH ₂ Ph	-2.5	-4.5
	(R,S)- 1.40b	NHCH ₂ Ph	-1.6	-2.9
	(S,S)- 1.40c	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	-3.5	-4.0
	(S,S)- 1.40d	NHChx	-3.0	-4.0
	(R,S)- 1.40d	NHChx	-2.5	-5.5
	(S,S)- 1.40e	N(CH ₃) ₂	-2.5	nd
	(R,S)- 1.40e	N(CH ₃) ₂	-2.5	nd
 <p>B</p>	(S,R)- 1.43a	CH ₃	-3.3	-5.1
	(R,R)- 1.43a	CH ₃	-2.4	-4.1, -5.4
	(S,S)- 1.43b	CH ₂ Ph	-3.6	-4.5
	(R,S)- 1.43b	CH ₂ Ph	-2.2	-5.3
	(S,S)- 1.43c	CH(CH ₃) ₂	-2.5	-8.1
	(R,S)- 1.43c	CH(CH ₃) ₂	-1.8	-4.8, -5.2
	(S,S)- 1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-3.5	-5.6
	(R,S)- 1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-2.2	-4.6
 <p>C</p>	(S,S)- 1.46a	Fmoc	-2.8	-4.7
	(S,S)- 1.46b	CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ Cl	-3.0	-4.3, -5.5
	(S,S)- 1.46c	CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂	-3.0	-4.7, -5.1
	(S,S)- 1.46d	CO ₂ Ph	-2.1	-4.0
	(S,S)- 1.46e	CO ₂ C ₁₀ H ₇	-3.1	-4.5
	(S,S)- 1.46f	SO ₂ C ₁₀ H ₇	-4.0	-4.6, -5.7
	(S,S)- 1.46g	CO(CH ₂) ₂ Ph	-2.7	-4.9, -5.6
	(S,S)- 1.46h	CONHCH ₂ Ph	-4.0	-4.8
	(S,S)- 1.46i	CONHCH(Me)Ph	-3.8	-4.7

^aValores en ppb/K. $\Delta\delta$ medido en DMSO-d₆, 30-60 °C. ^bNH del enlace peptídico.

^cCONH (serie A), CONH₂ (series B y C) C-terminales.

Rojo ($\Delta\delta/\Delta T < 3$ ppb/K) H protegido del disolvente.

Gris ($\Delta\delta/\Delta T: 3-4$ ppb/K) Rango de incertidumbre.

Azul ($\Delta\delta/\Delta T > 4$ ppb/K) H accesible al disolvente.

Como se observa en la Tabla 1.5, la mayoría de los derivados de las tres series de análogos presentaron un valor de $\Delta\delta/\Delta T$ inferior a 3 ppb/K para el protón α -NH enlace peptídico. Este dato es indicativo de la existencia de un enlace de hidrógeno entre dicho grupo NH y el grupo carbonilo *N*-terminal, en total concordancia con los valores de los desplazamientos químicos. En los restantes compuestos de las distintas series, los valores de $\Delta\delta/\Delta T$ para este mismo protón α -NH están en el rango de incertidumbre donde no es posible afirmar ni descartar totalmente la presencia de dicho enlace de hidrógeno intramolecular. En general, para los diastereoisómeros de los distintos derivados **1.40a-e** y **1.43a-d** se observan coeficientes de temperatura más pequeños (en valor absoluto) para los isómeros *R,S* que para los *S,S*.

Salvo para el compuesto (*R,S*)-**1.40b**, todos los derivados dipeptídicos presentaron valores de $\Delta\delta/\Delta T$ para los protones del grupo amida *C*-terminal superiores a 4 ppb/K, indicativos de una mayor accesibilidad de dichos protones al disolvente y que permiten descartar en la mayoría de los casos la existencia de un enlace de hidrógeno en esta posición. En el compuesto (*R,S*)-**1.40b**, los coeficientes de temperatura de los dos protones amida presentes en la molécula fueron inferiores a 3 ppb/K, indicativos de que ambos protones estaban formando enlaces de hidrógeno intramoleculares. Como se comentó anteriormente, el protón α -NH debe encontrarse formando el enlace de hidrógeno con el carbonilo del grupo benciloxicarbonilo (giro γ). El protón del grupo NHCH_2Ph podría establecer el enlace de hidrógeno con dos carbonilos diferentes de la molécula, pudiendo de este modo sugerirse dos posibles conformaciones para este derivado (Figura 1.12). Si este protón estuviese formando el enlace de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del residuo de azetidina, se estabilizaría la conformación **I** en la que coexistirían dos giros γ . Sin embargo, si el oxígeno implicado fuera el del grupo benciloxicarbonilo, se estabilizaría una conformación con dos giros simultáneos, γ y β^a (**II**).

^aUn giro β está formado por cuatro residuos consecutivos de aminoácidos formando un pseudociclo de diez miembros, estabilizados en general por la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo carbonilo del primer residuo y el NH del cuarto.

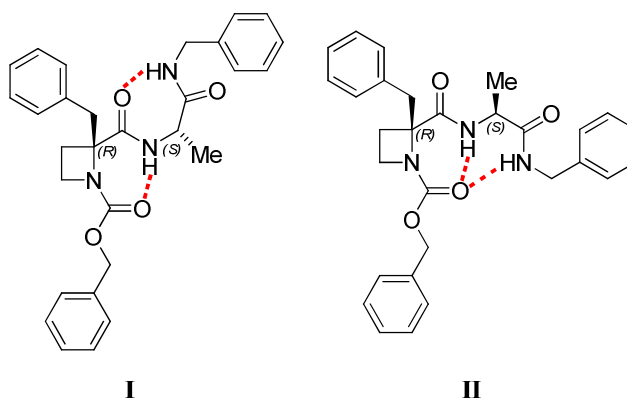


Figura 1.12. Posibles conformaciones para (R,S)-1.40b

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la gran mayoría de los derivados azetidínicos preparados adoptan preferentemente en disolución conformación de giro γ , centrada en el residuo de azetidina.

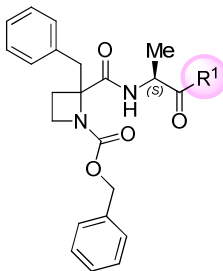
1.4.3. Evaluación biológica

Todos los productos descritos fueron enviados al Instituto Rega (Universidad de Lovaina) para ser evaluados como inhibidores de la replicación viral del CMVH en cultivos celulares por el equipo del Dr. Jan Balzarini. Además, para establecer la selectividad frente a CMVH, los compuestos se evaluaron en un amplio panel de virus que incluyeron: VIH-1, VIH-2, varicela zoster, coronavirus felino y humano (SARS), influenza, reovirus-1, sindbis, coxsackie, punta toro, estomatitis vesicular, sincitial y herpes 1 y 2.

Los resultados de actividad frente a CMVH están recogidos en las Tablas 1.6-1.8, junto con los datos de actividad biológica del prototipo de partida **1.29** y del fármaco de referencia Ganciclovir.

En la Tabla 1.6 se recogen los datos obtenidos para la serie **A**. Los derivados (*S,S*)-**1.40a**, (*R,S*)-**1.40a** y (*S,S*)-**1.40c**, que portan grupos *terc*-butilo e *iso*-butilo en el grupo amida en *C*-terminal respectivamente, presentaron valores de CE_{50} en el mismo rango que el prototipo **1.29**, lo que indica una clara preferencia por grupos alifáticos en esta posición. Tanto los derivados con un grupo bencilo (**1.40b**) como ciclohexilo (**1.40d**) resultaron ser inactivos. Cabe resaltar, la falta de inhibición de los derivados portadores de grupos dimetilamida **1.40e**, lo que podría sugerir que para la actividad es necesaria la presencia en esta posición de al menos un protón del grupo amida, como en los compuestos activos **1.28** y **1.29** (página 44). Aunque hay pocos compuestos activos dentro de esta serie, se observa una ligera preferencia por la conformación *S,S* frente a la *R,S* (compárense entre sí los diastereoisómeros de **1.40a** y **1.40c**).

Tabla 1.6. Actividad de los compuestos de la serie **A** frente a CMVH incubado en células de pulmón de embrión humano.

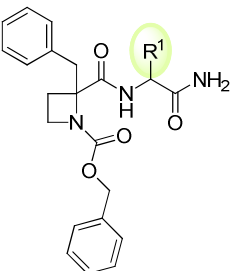
Serie	Compuesto	R ¹	CE ₅₀ (μM)	Citotoxicidad (μM)	
				MCC	CC ₅₀
 <p>A</p>	(S,S)- 1.40a	NHC(CH ₃) ₃	44.7	>100	>100
	(R,S)- 1.40a	NHC(CH ₃) ₃	48.9	>100	>100
	(S,S)- 1.40b	NHCH ₂ Ph	>20	100	42.5
	(R,S)- 1.40b	NHCH ₂ Ph	>4	≥20	42.5
	(S,S)- 1.40c	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	63.1	>100	>100
	(R,S)- 1.40c	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	>100	>100	>100
	(S,S)- 1.40d	NHChx	>100	>100	>100
	(R,S)- 1.40d	NHChx	>20	100	46.3
	(S,S)- 1.40e	N(CH ₃) ₂	>100	>100	>100
	(R,S)- 1.40e	N(CH ₃) ₂	>100	>100	>100
	(S,S)- 1.29	NH ₂	32	>50	50
Ganciclovir			0.42	1575	63

CE₅₀: Concentración inhibitoria requerida para reducir la formación del virus en un 50%.
MCC: Concentración citotóxica mínima que causa una alteración microscópicamente detectable de la morfología celular. CC₅₀: Concentración citotóxica mínima requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%.

En la serie **B** (Tabla 1.7), los compuestos (S,R)-**1.43a**, (S,S)-**1.43c** y (R,S)-**1.43d**, derivados respectivamente de D-alanina, valina y leucina, mostraron valores de CE₅₀ comparables al del producto **1.29**. Por otra parte, los derivados de fenilalanina (**1.43b**), lisina (**1.43e**) y ácido glutámico (**1.43f**) resultaron ser inactivos. Estos datos sugieren una preferencia por aminoácidos alifáticos en C-terminal, aunque ni el aumento de volumen de la cadena lateral alifática (Leu, Val), ni el cambio en la configuración del grupo metilo del residuo de Ala consiguieron mejorar la actividad obtenida para el compuesto modelo **1.29**. Comparando la actividad de (S,S)-**1.43a** y (R,R)-**1.43a**, se observa de nuevo la preferencia por una configuración 2S en el anillo de azetidina, al igual que para el análogo derivado de Val **1.43c**. Por el contrario, para el derivado de Leu **1.43d** se observó el efecto contrario, con mejores datos de inhibición del CMVH para el diastereoisómero de configuración R,S.

En general, todos los compuestos de esta serie fueron también bastante citotóxicos, especialmente el análogo que posee un residuo de D-Ala en posición C-terminal.

Tabla 1.7. Actividad de los compuestos de la serie **B** frente a CMVH incubado en células de pulmón de embrión humano.

Serie	Compuesto	R ¹	CE ₅₀ (μM)	Citotoxicidad (μM)	
				MCC	CC ₅₀
 <p>B</p>	(<i>S,R</i>)- 1.43a	Me	63	>100	35.8
	(<i>R,R</i>)- 1.43a	Me	>100	>100	>100
	(<i>S,S</i>)- 1.43b	CH ₂ Ph	>20	100	33.3
	(<i>R,S</i>)- 1.43b	CH ₂ Ph	>20	100	37
	(<i>S,S</i>)- 1.43c	CH(CH ₃) ₂	76	>100	100
	(<i>R,S</i>)- 1.43c	CH(CH ₃) ₂	>100	>100	85
	(<i>S,S</i>)- 1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	>20	100	49.6
	(<i>R,S</i>)- 1.43d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	44.7	>100	65.6
	1.43e	(CH ₂) ₄ NH ₂	>100	>100	>100
	1.43f	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	>100	>100	>100
	(<i>S,S</i>)- 1.29	Me	32	>50	50
Ganciclovir			0.42	1575	63

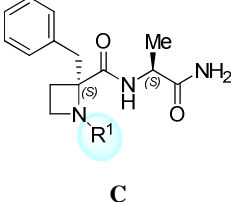
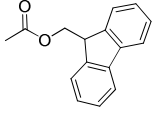
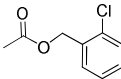
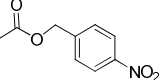
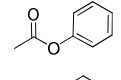
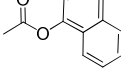
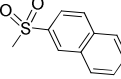
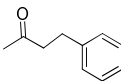
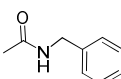
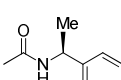
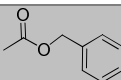
CE₅₀: Concentración inhibitoria requerida para reducir la formación del virus en un 50%.

MCC: Concentración citotóxica mínima que causa una alteración microscópicamente detectable de la morfología celular. CC₅₀: Concentración citotóxica mínima requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%.

Como se muestra en la Tabla 1.8, en la serie **C** todos los derivados preparados resultaron ser inactivos, excepto el compuesto (*S,S*)-**1.46e**, que porta un grupo 1-naftilcarbamato. Este sustituyente puede ser considerado un análogo conformacionalmente restringido del grupo benciloxicarbonilo, presente en el prototipo **1.29**. Estos resultados sugieren que el grupo Z juega un papel clave en la actividad de estos compuestos, ya que pequeños cambios, como la incorporación de diferentes tipos de sustituyentes en el anillo aromático (**1.46b**, **1.46c**), el acortamiento en la cadena de bencilo a fenilo (**1.46d**) y la sustitución del oxígeno del grupo uretano por CH₂ o NH (**1.46g**, **1.46h**, **1.46i**), han dado lugar a análogos inactivos.

Cabe resaltar la alta toxicidad del compuesto **1.46a**, con un grupo fluorenilmtoxycarbonilo (Fmoc), en relación al resto de compuestos de la serie. Posiblemente esta toxicidad se pueda explicar por la formación de 9-metilfluoreno *in vitro* debido a la desprotección del grupo Fmoc mediante la β-eliminación catalizada por grupos amino presentes en el medio de cultivo. Aunque, en nuestro conocimiento, esta desprotección *in vitro* no se ha descrito en la literatura, la toxicidad del fluoreno y derivados si es bien conocida^{64,65}.

Tabla 1.8. Actividad de los compuestos de la serie C frente a CMVH incubado en células de pulmón de embrión humano.

Serie	Compuesto	R ¹	CE ₅₀ (μM)	Citotoxicidad (μM)	
				MCC	CC ₅₀
 <p>C</p>	(S,S)- 1.46a		>4	20	14.2
	(S,S)- 1.46b		>20	>100	>100
	(S,S)- 1.46c		>20	100	>100
	(S,S)- 1.46d		>20	>100	>100
	(S,S)- 1.46e		44.7	>100	>100
	(S,S)- 1.46f		>100	>100	>100
	(S,S)- 1.46g		>100	100	>100
	(S,S)- 1.46h		>100	>100	>100
	(S,S)- 1.46i		>100	>100	>100
	(S,S)- 1.29		32	>50	50
Ganciclovir			0.42	1575	63

CE₅₀: Concentración inhibitoria requerida para reducir la formación del virus en un 50%.
MCC: Concentración citotóxica mínima que causa una alteración microscópicamente detectable de la morfología celular. CC₅₀: Concentración citotóxica mínima requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%

Todos los compuestos fueron totalmente inactivos frente al resto de los virus ensayados, con excepción de los derivados activos frente a CMVH de las series A y C, que inhibieron también moderadamente la replicación del virus varicela Zoster (44-67 μM). Por otra parte, el derivado de Leu (R,S)-**1.43d** mostró actividad, aunque moderada en los ensayos del virus corona felino (CE₅₀=37±15μM) y humano (CE₅₀=69±27μM).

En resumen, se han sintetizado y evaluado tres series de análogos estructurales de un inhibidor de CMVH. Desafortunadamente, las modificaciones llevadas a cabo no han conducido a compuestos más activos que el modelo del que se partía. Sin embargo, se pueden extraer algunas relaciones estructura-actividad que indican que es importante la existencia de grupos alifáticos en el extremo C-terminal, bien en el aminoácido o bien en el grupo amida, y que la presencia del grupo benciloxycarbonilo en el nitrógeno azetidínico es un requisito indispensable para la actividad en esta familia de compuestos.

El compuesto prototipo (*S,S*)-**1.29** podría ser susceptible de otras modificaciones, como la incorporación de sustituyentes en posición 3 del anillo de azetidina o la sustitución del grupo bencilo en posición 2, proveniente de la cadena lateral de Phe, por cadenas laterales de otros aminoácidos de distinta naturaleza. Aunque todavía queda por explorar la posible influencia en la actividad antiviral de estas modificaciones adicionales, el hecho de que con los 29 nuevos compuestos evaluados no se haya conseguido en ningún caso mejorar la actividad del prototipo nos induce a pensar que exista alguna característica estructural en todos ellos que dificulta una interacción apropiada con la diana biológica.

Como se ha explicado detalladamente en el apartado 1.4.2 de este capítulo, la mayoría de los dipéptidos azetidínicos preparados adoptan en disolución conformaciones de giro γ , centradas en el residuo de azetidina. Teniendo en cuenta que se ha descrito que las proteasas reconocen preferentemente a los sustratos y ligandos peptídicos en conformaciones extendidas⁶⁶, este giro podría no ser la conformación más adecuada si la diana biológica fuera la proteasa de CMVH, hecho que aún no se ha comprobado. Por ello, una posibilidad a explorar podría ser el aumento de flexibilidad de nuestros derivados peptídicos, o la preparación de análogos que fijen la conformación extendida, para permitirles un mejor acomodo en el centro activo de la proteasa.

1.5. CONCLUSIONES

Con objeto de intentar obtener inhibidores más potentes y seguros frente al citomegalovirus humano (CMVH), se han preparado y estudiado tres series de análogos estructurales (**A-C**) del compuesto prototipo **1.29** (Figura 1.13), perteneciente a una familia de dipéptidos azetidínicos, previamente descubiertos en nuestro grupo de investigación como inhibidores no covalentes de este virus.

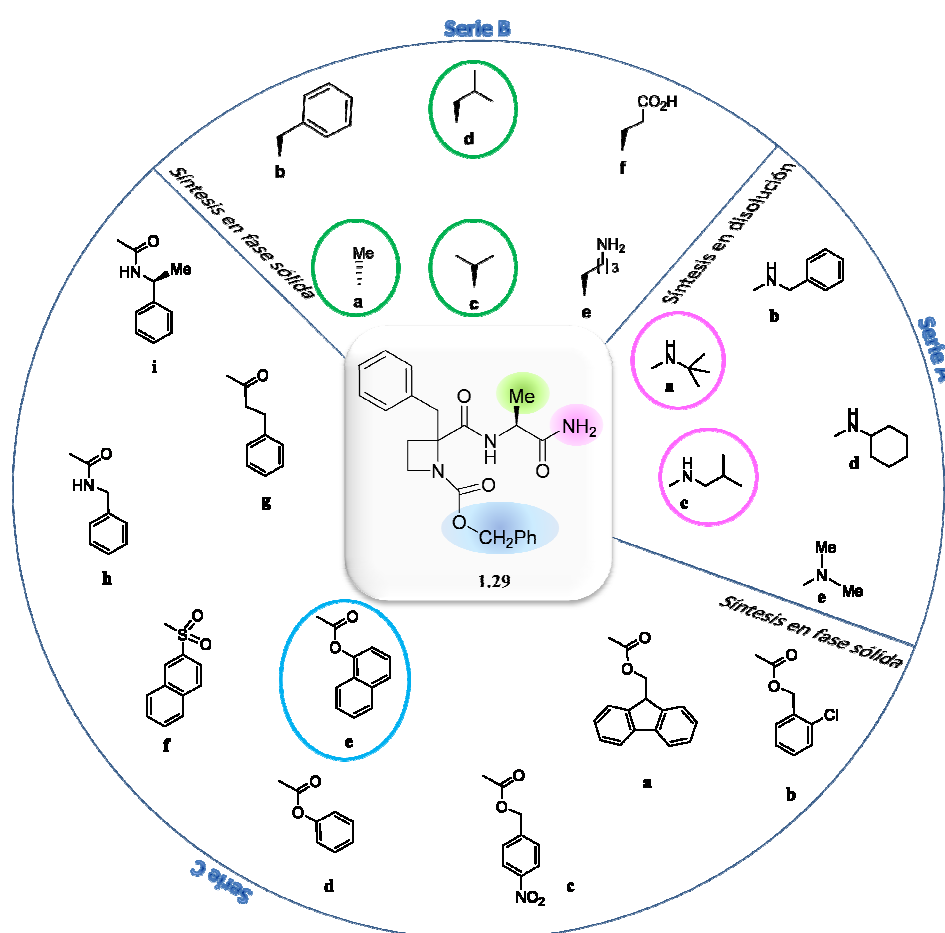


Figura 1.13. Resumen del trabajo realizado en este capítulo y modificaciones que condujeron a análogos activos (enmarcadas con círculos en cada serie)

Los principales resultados del trabajo realizado se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

- Se han preparado, empleando metodologías de síntesis en disolución o fase sólida, tres series de dipéptidos conformacionalmente restringidos, que incorporan como elemento de restricción la correspondiente azetidina derivada de fenilalanina.
- Estudios conformacionales en disolución, realizados mediante experimentos de ^1H -RMN en diferentes disolventes y a temperatura variable, han permitido analizar la conformación preferente de los compuestos objeto de estudio, observándose que tienen una alta tendencia a adoptar conformaciones de tipo giro γ , centradas en el anillo de azetidina.
- Los resultados obtenidos en los ensayos biológicos indicaron que únicamente los derivados con grupos alifáticos en el residuo C-terminal, bien en la cadena lateral del aminoácido o en el grupo carboxamida, son inhibidores moderados de la replicación de CMVH en cultivos celulares. Estos compuestos presentaron valores de CE_{50} comparables a los del modelo de partida.
- El grupo *N*-benciloxycarbonilo en el residuo de azetidina parece desempeñar un papel clave en la actividad antiviral de esta familia de compuestos, ya que, de todas las modificaciones realizadas en este sustituyente, tan solo el derivado con un grupo *N*-1-naftilcarbamato mostró actividad significativa.
- En esta serie de compuestos, no se observó una interdependencia clara entre la actividad anti-CMVH y la configuración de los distintos centros estereogénicos de la molécula.

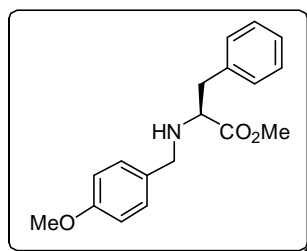
1.6. PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades: Los espectros de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Varian INOVA-300 (300 MHz) o Bruker 300 (300 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los espectros de ^{13}C RMN se registraron en un Varian INOVA-300 (75 MHz) o Bruker 300 (75 MHz). Los espectros de masas (Electrospray, modo positivo) se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard 1100SD. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en columna de gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh). Los HPLC analíticos se realizaron en un aparato Waters utilizando la columna de fase reversa Novapak C_{18} (3.9 x 150 mm, 4 μM). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas $\text{CH}_3\text{CN(A)}/\text{H}_2\text{O(0.05\% TFA)(B)}$. En todos los casos el flujo fue de 1ml/min y la detección de picos se realizó por UV a 214 nm. Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141. Los análisis elementales han sido realizados en un analizador Carlo Erba EA1108 y en un LECO CHNS-932. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Reichert-Jung Kofler y están sin corregir.

Para aquellos compuestos que han sido descritos anteriormente se indica la referencia correspondiente en cada caso.

1.6.1. Síntesis en disolución de azetidinas precursoras

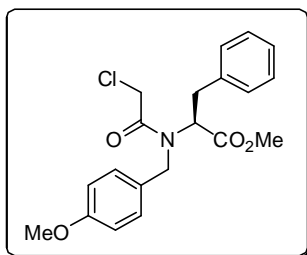
N-p-Metoxibencil-Phe-OMe (**1.30**)⁵³



Se disuelve H-Phe-OMe-HCl (5 g, 23.18 mmol) en MeOH (30 ml), se añade TEA (3.22 ml, 23.18 mmol) y *p*-anisaldehído (3.37 ml, 27.82 mmol) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h y 30 min. Transcurrido este tiempo se enfría la disolución a 0 °C y se añade NaBH_4 (1.75 g, 46.36 mmol) dejando reaccionar 30 min. Tras evaporación del disolvente, se disuelve el crudo en AcOEt y se lava con H_2O y disolución saturada NaCl, secando la fase orgánica con Na_2SO_4 . Tras purificación por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente un gradiente de 6 a 10 % de AcOEt en hexano, se consiguieron aislar 6.52 g (94%) de **1.30** en forma de aceite. ^1H RMN (300

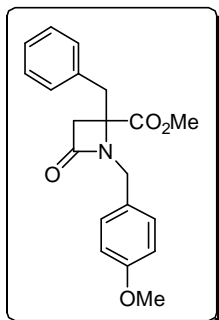
MHz, CDCl₃): δ 7.22-7.13 (m, 3H, Ph), 7.15 (d, 2H, J = 8.7, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 7.04-7.09 (m, 2H, Ph), 6.73 (d, 2H, J = 8.7, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.66 (d, 1H, J = 13.2, N-CH₂), 3.56 (s, 3H, OMe), 3.49 (d, 1H, J = 13.2, N-CH₂), 3.45 (t, 1H, J = 6.8, α -*H* Phe), 2.89 (d, 2H, J = 6.8, β -*H* Phe). EM (ES modo positivo): 300.4 [M+1]⁺.

***N*-Cloroacetyl-*N*-*p*-metoxibencil-Phe-OMe (**1.31**)**⁵³



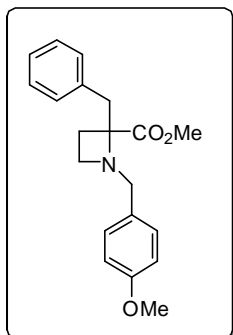
Se disuelve Pmb-Phe-OMe (**1.30**) (5.10 g, 17.03 mmol) en THF (50 ml) y se añade óxido de propileno (17.90 ml, 255.64 mmol). Se enfría la disolución a 0°C y se añade cloruro de cloroacetyl (1.63 ml, 20.45 mmol). Tras 2 h de agitación a temperatura ambiente se evapora el disolvente y se purifica el residuo resultante por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt:hexano (1:4). De esta forma se obtienen 6.27 g (98%) del producto **1.31** en forma de aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27-6.75 (m, 9H, Ar), 4.36 (d, 1H, J = 6.3, N-CH₂), 4.12-4.00 (m, 3H, α -*H* Phe y CH₂Cl), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.66 (d, 1H, J = 6.3, 1H, N-CH₂), 3.61 (s, 3H, OMe), 3.29 (m, 2H, β -*H* Phe). EM (ES modo positivo): 398.1 [M+Na]⁺.

(4*R*,*S*)-4-Bencil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidina (1.32**)**⁵³



A una disolución del compuesto **1.31** (7.63 g, 20.30 mmol) en CH₃CN seco (75 ml) se añade Cs₂CO₃ (13.22 g, 40.59 mmol) y se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Tras 5 días se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve el crudo en AcOEt:H₂O (1:1). Se separa la fase orgánica y se lava con HCl (0.1 N), H₂O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. El crudo de reacción se purifica en columna de gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de 20 a 33 % de AcOEt en hexano, obteniéndose 5.19 g (75%) del producto **1.32** en forma de sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.25-6.82 (m, 9H, Ar), 4.38 (m, 2H, 1-CH₂), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.47 (s, 3H, OMe), 3.24 (d, 1H, J = 14.0, 4-CH₂), 3.22 (d, 1H, J = 14.7, 3-*H*), 2.92 (d, 1H, J = 14.0, 4-CH₂), 2.89 (d, 1H, J = 14.7, 3-*H*). EM (ES modo positivo): 340.1 [M+1]⁺.

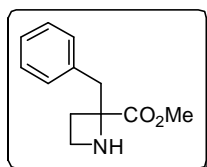
(2*R,S*)-2-Bencil-1-*p*-metoxibencil-2-metoxicarbonilazetidina (1.33)⁵⁷



A una disolución de la azetidinona **1.32** (6.40 g, 18.86 mmol) en THF seco (30 ml), en atmósfera de Ar, se le adiciona hidruro de tris(trifenilfosfina)carbonil rodio (I) (0.17 g, 1%) y difenilsilano (8.7 ml, 47.15 mmol). Después de 15 h de reacción a temperatura ambiente, se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se disuelve en éter etílico y se lava sucesivas veces con disolución 1M de HCl. La fase acuosa se lleva a pH 10 con NaOH 2N y se extrae con AcOEt. Esta segunda fase orgánica se lava con

disolución saturada de NaCl y seca sobre Na₂SO₄. El crudo resultante se purifica en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt:hexano (1:10), obteniéndose 5.43 g del producto **1.33** (88 %) en forma de sólido. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.18 (m, 7H, Ph, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.80 (d, 2H, *J* = 9.2, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.67 (d, 1H, *J* = 12.7, 1-CH₂), 3.50 (d, 1H, *J* = 12.7, 1-CH₂), 3.21 (d, 1H, *J* = 13.3, 2-CH₂), 3.10 (m, 2H, 4-*H*), 3.09 (d, 1H, *J* = 13.3, 2-CH₂), 2.41 (m, 1H, 3-*H*), 2.12 (m, 1H, 3-*H*). EM (ES modo positivo): 326.4 [M+1]⁺.

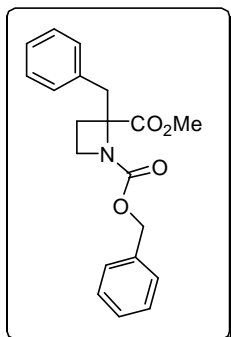
(2*R,S*)-2-Bencil-2-metoxicarbonilazetidina (1.34)⁵⁷



A una disolución de la correspondiente 1-*p*-metoxibencil-azetidina **1.33** (2.69 g, 8.27 mmol) en MeOH (75 ml) se le añade HCl 12M (0.73 ml, 8.27 mmol) y Pd(OH)₂ (0.54 g, 20%), en el citado orden. La suspensión se hidrogena a 50°C y 40 psi de presión durante 15 h.

Tras filtración del catalizador se evapora el disolvente a sequedad y el residuo resultante de la eliminación del grupo 1-*p*-metoxibencilo se trata con disolución 1M de HCl y se lava con Et₂O. La fase acuosa se neutraliza con NaOH 2N y se extrae con AcOEt. La nueva fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora a sequedad para de esta forma dar lugar a la azetidina **1.34** como amina libre. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.14 (m, 5H, Ph), 3.63 (s, 3H, OMe), 3.40 (m, 1H, 4-*H*), 3.17 (m, 1H, 4-*H*), 3.05 (m, 2H, 2-CH₂), 2.40 (m, 2H, 3-*H*). EM (ES modo positivo): 206.1 [M+1]⁺.

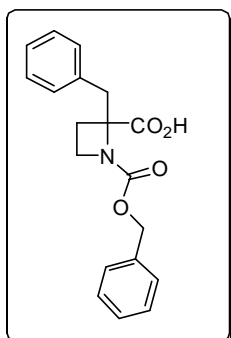
(2*R,S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-metoxycarbonilazetidina (1.35)⁵²



A una disolución de la azetidina **1.34** (3.39 g, 16.52 mmol) en CH₂Cl₂ seco (40 ml), enfriada a 0°C, se le añade óxido de propileno (17.55 ml, 243 mol) y cloroformiato de bencilo (4.66 ml, 33.03 mmol). Tras 15 h de reacción a temperatura ambiente, el disolvente se evapora a sequedad y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como sistema de eluyentes una mezcla de AcOEt:hexano (1:6), obteniéndose de este modo 3.92 g de la azetidina **1.35** (70%) en

forma de aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (1.2:1) δ rotámero mayoritario 7.30-7.07 (m, 10H, Ph), 5.18 (d, 1H, *J* = 12.2, CH₂-Z), 5.06 (d, 1H, *J* = 12.2, CH₂-Z), 3.76 (m, 1H, 4-*H*), 3.55 (s, 3H, OMe), 3.24 (d, 1H, *J* = 14.5, 2-CH₂), 3.08 (m, 1H, 4-*H*), 3.02 (d, 1H, *J* = 14.5, 2-CH₂), 2.10 (m, 2H, 3-*H*). EM (ES modo positivo): 340.1 [M+1]⁺.

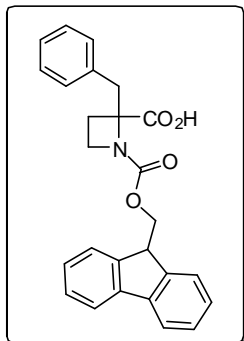
(2*R,S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-carboxi-azetidina (1.36)⁵²



A una disolución del compuesto **1.35** (1.54 g, 4.53 mmol) en MeOH (10 ml) se le adiciona NaOH 2N (5.7 ml, 11.33 mmol). Tras 15h de reacción, se evapora el MeOH a sequedad. El residuo resultante se disuelve en agua, se acidifica a pH 3 y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora a sequedad. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como sistema de eluyentes una mezcla de

MeOH:CH₂Cl₂ (1:20), obteniéndose de este modo 1.25 g del derivado azetidínico **1.36** (85%) en forma de aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (1.2:1) δ rotámero mayoritario 10.36 (s ancho, 1H, CO₂H), 7.41-7.12 (m, 10H, Ph), 5.33 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 5.12 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 3.60 (m, 1H, 4-*H*), 3.51 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 3.00 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.98 (m, 1H, 4-*H*), 2.63 (m, 1H, 3-*H*), 2.23 (m, 1H, 3-*H*). EM (ES modo positivo): 326.4 [M+1]⁺.

(2*R,S*)-2-Bencil-1-(9-fluorenilmetoxi)carbonil-2-carboxi-azetidina (1.37)



Se disuelve la azetidina **1.34** (1.57 g, 7.64 mmol) en MeOH (20 ml) y se añade NaOH 2N (19.1 ml, 9.55 mmol) dejando reaccionar 24 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente, el crudo de reacción se disuelve en agua y se lava con AcOEt. La fase acuosa se liofiliza y el residuo obtenido se disuelve en una mezcla de Na₂CO₃ aq (10%)/dioxano (20 ml/12 ml) a 0 °C. Se añade Cl-Fmoc (1.97 g, 7.64 mmol) disuelto en dioxano (12 ml) y se mantiene la temperatura de reacción a 0 °C

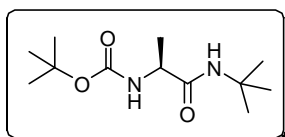
durante 1 h, tras lo que se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 h más. Transcurrido este tiempo, se añade H₂O a la reacción y se lava el crudo con Et₂O. Se acidifica la fase acuosa mediante adición de HCl 1M hasta pH=2 y se extrae el producto con AcOEt. La fase orgánica se lava con H₂O y se seca sobre Na₂SO₄, tras lo cual se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como sistema de eluyentes una mezcla de AcOEt:CH₂Cl₂ (1:7), obteniéndose de este modo 1.89 g del derivado azetidínico **1.37** (60%, a partir de **1.34**) en forma de sólido. P.f.: 88-90 °C. HPLC: *t*_R= 5.78 min. (A:B = 35:65). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (3.2:1) δ rotámero mayoritario 7.85-7.18 (m, 13H, Ar), 4.56-4.48 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.34 (m, 1H, CH-Fmoc), 3.75 (m, 1H, 4-*H*), 3.56 (d, 1H, *J* = 14.2, 2-CH₂), 3.18 (m, 1H, 4-*H*), 3.09 (d, 1H, *J* = 14.2, 2-CH₂), 2.63 (m, 1H, 3-*H*), 2.32 (m, 1H, 3-*H*). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 177.1 (CO₂H), 157.2 (1-CO), 144.4, 143.7, 142.5, 138.9, 137.2, 135.4, 133.2, 131.5, 129.3 128.8, 127.6 127.1, 125.5, 124.9, 124.8, 123.2, 121.7, 120.4 (*C* Ar), 73.5 (2-*C*), 68.4 (CH₂-Fmoc), 47.1 (CH-Fmoc), 44.9 (4-*C*), 39.1 (2-CH₂), 24.5 (3-*C*). EM (ES modo positivo): 414.5 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₆H₂₃NO₄: C, 75.53; H, 5.61; N, 3.39. Exp: C, 75.78; H, 5.73; N, 3.42.

1.6.2. Síntesis de derivados modificados en el grupo amida (serie A)

1.6.2.1. Procedimiento general para la preparación de compuestos Boc-Ala-NR¹R²

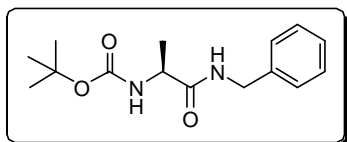
A una disolución de Boc-Ala-OH (300 mg, 1.58 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) se le adiciona sucesivamente la amina correspondiente (2.05 mmol), BOP (0.91 g, 2.05 mmol) y TEA (0.28 ml, 2.05 mmol o 0.57 ml, 4.11 mmol en el caso del hidrocloreto de dimetilamina). Tras una noche de agitación a temperatura ambiente se evapora el disolvente, y el residuo resultante se lava sucesivamente con ácido cítrico (10%), NaHCO₃ (10%) y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

Boc-L-Ala-NH^{*i*}Bu (1.38a)⁶⁷



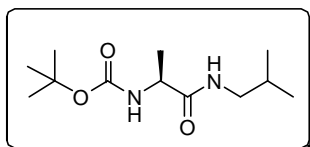
Sólido. P.f.: 100-102 °C (publicado 104 °C). Rdto: 82%. AcOEt: hexano, 1:3. $[\alpha]_D = -49.5$ (*c* 1, CHCl₃). ¹H RMN (CDCl₃) δ : 5.93 (s ancho, 1H, NH^{*i*}Bu), 4.99 (s ancho, 1H, NHBoc), 4.01 (m, 1H, α -H Ala), 1.44 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.33 (s, 9H, ^{*t*}BuNH), 1.30 (d, 3H, *J* = 7.0, CH₃). EM (ES modo positivo): 267.2 [M+Na]⁺.

Boc-L-Ala-NHBn (1.38b)⁶⁸



Sólido. P.f.: 97-99 °C (publicado 100-102°C). Rdto: 83%. AcOEt: hexano, 1:3. $[\alpha]_D = -23.9$ (*c* 1, CHCl₃). ¹H RMN (CDCl₃) δ : 7.34-7.24 (m, 5H, Ph), 6.56 (s ancho, 1H, NHBn), 5.0 (s ancho, 1H, NHBoc), 4.44 (d, 2H, *J* = 5.4, CH₂Ph), 4.19 (m, 1H, α -H Ala), 1.41 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.38 (d, 3H, *J* = 7.1, CH₃). EM (ES modo positivo): 301.2 [M+Na]⁺.

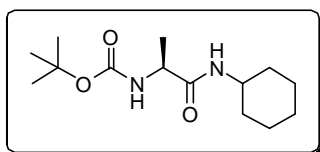
Boc-L-Ala-NH^{*i*}Bu (1.38c)



Sólido. P.f.: 95-97 °C. Rdto: 83%. AcOEt: hexano, 1:2. $[\alpha]_D = -45.8$ (*c* 1, CHCl₃). ¹H RMN (CDCl₃) δ : 6.22 (s ancho, 1H, NH^{*i*}Bu), 4.96 (s ancho, 1H, NHBoc), 4.12 (m, 1H, α -H Ala), 3.08 (t, 2H, *J* = 6.1, CH₂-^{*i*}Bu), 1.77 (m, 1H, CH-^{*i*}Bu), 1.44 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.35 (d, 3H, *J* = 7.0, CH₃ Ala), 0.90 (d, 6H, *J* = 6.7, CH₃-^{*i*}Bu). ¹³C

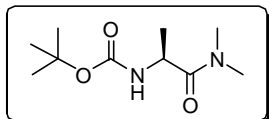
RMN (CDCl_3) δ : 172.7 (CO-Ala), 155.5 (CO-Boc), 79.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 50.1 (α -C Ala), 46.7 (CH_2 - i Bu), 28.7 (CH - i Bu), 28.3 (CH_3 -Boc), 19.9 (CH_3 - i Bu), 18.3 (CH_3 Ala). EM (ES modo positivo): 267.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. (%) Calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 58.99; H, 9.90; N, 11.47. Anal. Exp. (%): C, 59.13; H, 10.05; N, 11.58.

Boc-L-Ala-NHChx (1.38d)



Sólido. P.f.: 156-158 °C. Rdto: 81%. AcOEt: hexano, 1:2. $[\alpha]_D = -39.3$ (c 1, CHCl_3). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 6.18 (s ancho, 1H, NH-Chx), 5.13 (s ancho, 1H, NHBoc), 4.08 (m, 1H, α -H Ala), 3.71 (m, 1H, H_1 -Chx), 1.85-1.10 (m, 10H, (CH_2)₅ Chx), 1.42 (s, 9H, CH_3 -Boc), 1.31 (d, 3H, $J = 6.9$, CH_3). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 171.6 (CO-Ala), 155.5 (CO Boc), 79.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 50.0 (α -C Ala), 48.0 (C_1 -Chx), 32.8 (C_2 y C_6 Chx), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.4 (C_4 Chx), 24.7 (C_3 y C_5 Chx), 18.3 (CH_3). EM (ES modo positivo): 293.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. (%) Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 62.19; H, 9.69; N, 10.36. Anal. Exp. (%): C, 62.09; H, 9.53; N, 10.28.

Boc-L-Ala-N(CH₃)₂ (1.38e)

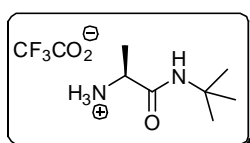


Sólido. P.f.: 104-106 °C. Rdto: 45%. AcOEt: hexano, 2:3. $[\alpha]_D = +14.3$ (c 1, CHCl_3). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 5.50 (s ancho, 1H, NHBoc), 4.57 (m, 1H, α -H Ala), 3.01 (s, 3H, NCH_3), 2.91 (s, 3H, NCH_3), 1.38 (s, 9H, CH_3 -Boc), 1.24 (d, 3H, $J = 6.8$, CH_3 Ala). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 172.6 (CO-Ala), 155.0 (CO Boc), 79.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 46.1 (α -C Ala), 36.8 (NCH_3), 35.6 (NCH_3), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.9 (CH_3). EM (ES modo positivo): 239.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. (%) Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 55.53; H, 9.32; N, 12.95. Anal. Exp. (%): C, 55.61; H, 9.07; N, 12.87.

1.6.2.2. Procedimiento general para la síntesis de H-Ala-NR¹R²

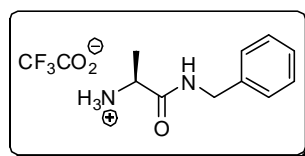
A una disolución de las correspondientes amidas de Boc-Ala-NR¹R² (**1.38a-e**) (0.46 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (3ml), se añade TFA (2 ml). Tras 4 h de reacción a temperatura ambiente se evapora el disolvente a sequedad, coevaporando varias veces con CH₂Cl₂. Los productos se obtienen con rendimientos cuantitativos y no requieren purificación posterior.

H-L-Ala-NH^tBu TFA (**1.39a**)⁶⁹



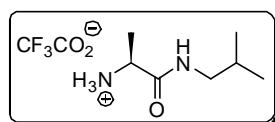
Aceite. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8.02 (s ancho, 3H, ⁺NH₃), 7.98 (s ancho, 1H, NH^tBu), 3.73 (m, 1H, α-H Ala), 1.28 (d, 3H, *J* = 7.1, CH₃), 1.28 (s, 9H, ^tBuNH). EM (ES modo positivo): 167.2 [M+Na]⁺.

H-L-Ala-NHBn TFA (**1.39b**)⁷⁰



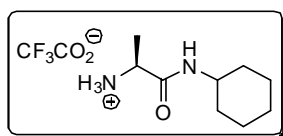
Aceite. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8.89 (m, 1H, NHBn), 8.12 (s ancho, 3H, ⁺NH₃), 7.37-7.55 (m, 5H, *Ph*), 4.34 (d, 2H, *J* = 5.9, CH₂Ph), 3.86 (m, 1H, α-H Ala), 1.38 (d, 3H, *J* = 7.0, CH₃). EM (ES modo positivo): 201.3 [M+Na]⁺.

H-L-Ala-NHⁱBu TFA (**1.39c**)



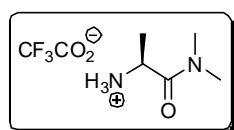
Aceite. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8.34 (m, 1H, NHⁱBu), 8.07 (s ancho, 3H, ⁺NH₃), 3.82 (m, 1H, α-H Ala), 3.05-2.85 (m, 2H, *J* = 6.1, CH₂-ⁱBu), 1.71 (m, 1H, CH-ⁱBu), 1.34 (d, 3H, *J* = 7.0, CH₃), 0.85 (d, 6H, *J* = 6.6, CH₃-ⁱBu). EM (ES modo positivo): 167.3 [M+Na]⁺.

H-L-Ala-NHChx TFA (**1.39d**)⁷¹



Aceite. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8.22 (d, 1H, *J* = 7.7, NH-Chx), 8.05 (s ancho, 3H, ⁺NH₃), 3.74 (m, 1H, α-H Ala), 3.55 (m, 1H, H₁-Chx), 1.77-1.09 (m, 10H, (-CH₂)₅ Chx), 1.31 (d, 3H, *J* = 7.0, CH₃). EM (ES modo positivo): 193.3 [M+Na]⁺.

H-L-Ala-N(CH₃)₂ TFA (**1.39e**)

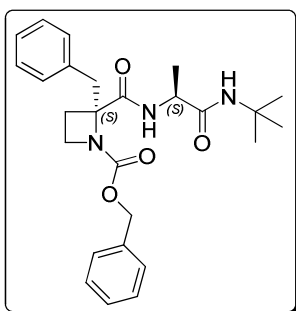


Aceite. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8.10 (s ancho, 3H, ⁺NH₃), 4.33 (m, 1H, α-H Ala), 3.00 (NCH₃), 2.88 (NCH₃), 1.29 (d, 3H, *J* = 6.9, CH₃-Ala). EM (ES modo positivo): 139.2 [M+Na]⁺.

1.6.2.3. Procedimiento general para la reacción de acoplamiento en disolución

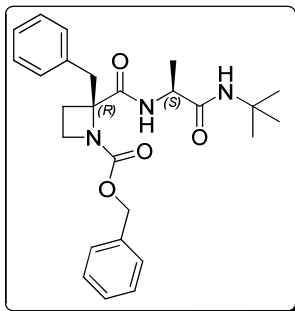
Sobre una disolución del correspondiente trifluoroacetato de H-Ala-NR¹R² **1.39a-e** (0.36 mmol) en THF seco (5 ml) se añade sucesivamente el derivado azetidínico **1.36** (58 mg, 0.18 mmol), BOP (0.16 g, 0.36 mmol) y Et₃N (0.1 ml, 0.72 mmol). Tras una noche de agitación, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt y se lava sucesivamente con ácido cítrico (10%), NaHCO₃ (10%) y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes AcOEt:Et₂O:Hexano (1:1:1).

(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-*tert*-butilcarbamoil)etil]carbamoil azetidina ((*S,S*)-**1.40a**)



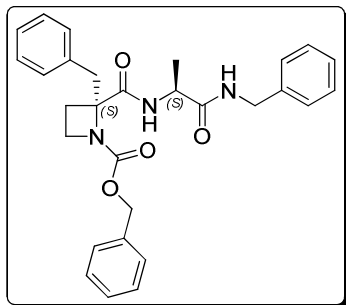
Aceite viscoso. Rdto: 58 %. $[\alpha]_D = +7.3$ (*c* 0.49, CHCl₃). HPLC: $t_R = 19.79$ min (A:B = 50:50). ¹H RMN (CDCl₃) Proporción de rotámeros (8.2:1) δ rotámero mayoritario: 8.29 (s ancho, 1H, 1'-NH), 7.47-7.11 (m, 10H, Ph), 6.26 (s ancho, 1H, NH^tBu), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.7, CH₂-Z), 5.08 (d, 1H, *J* = 12.7, CH₂-Z), 4.34 (m, 1H, 1'-H), 3.51 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 3.48 (m, 1H, 4-H), 2.91 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 2.84 (dd, 1H, *J* = 8.9, 16.2, 4-H), 2.58 (ddd, 1H, *J* = 7.4, 8.9 y 15.3, 3-H), 2.17 (ddd, 1H, *J* = 4.6, 8.9 y 15.3, 3-H), 1.37 (d, 3H, *J* = 7.3, 1'-CH₃), 1.34 (s, 9H, ^tBu). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros (5.2:1) δ rotámero mayoritario 8.20 (d ancho, 1H, *J* = 7.7, 1'-NH), 7.79 (d ancho, 1H, *J* = 7.3, NH^tBu), 7.45-7.13 (m, 10H, Ph), 5.24 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 5.04 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 4.29 (m, 1H, 1'-H), 3.53 (m, 1H, 4-H), 3.31 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 3.03 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 2.88 (dd, 1H, *J* = 8.1, 16.5, 4-H), 2.32 (m, 1H, 3-H), 2.10 (m, 1H, 3-H), 1.27 (s, 9H, ^tBu), 1.20 (d, 3H, *J* = 6.9, 1'-CH₃). ¹³C RMN (CDCl₃) δ rotámero mayoritario: 174.3, 170.8 (CONH), 156.3 (1-CO), 136.2, 134.7 (C-Ar), 130.5, 128.6, 128.4, 127.1 (CH-Ar), 73.4 (2-C), 67.0 (CH₂-Z), 51.0 (C(CH₃)₃), 49.6 (1'-C), 44.8 (4-C), 39.0 (2-CH₂), 28.7 (C(CH₃)₃), 23.2 (3-C), 17.0 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 452.2 [M+1]⁺, 474.2 [M+Na]⁺. Anal. (%) Cal. para C₂₆H₃₃N₃O₄: C 69.16, H 7.37, N 9.31 Exp: C 68.87, H 7.61, N 9.29.

(2*R*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-*terc*-butilcarbamoil)etil]carbamoil azetidina ((*R,S*)-1.40a)



Aceite viscoso. Rdto: 25%. $[\alpha]_D = -47.5$ (c 0.61, CHCl_3). HPLC: $t_R = 17.60$ min (A:B = 50:50). ^1H RMN (CDCl_3) Proporción de rotámeros (6.8:1) δ rotámero mayoritario: 8.14 (s ancho, 1H, 1'-NH), 7.46-7.06 (m, 10H, *Ph*), 6.15 (s ancho, 1H, NH^tBu), 5.34 (d, 1H, $J = 12.2$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.03 (d, 1H, $J = 12.2$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.36 (m, 1H, 1'-H), 3.51 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 3.47 (m, 1H, 4-H), 2.95 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.86 (dd, 1H, $J = 8.9$, 16.6, 4-H), 2.53 (ddd, 1H, $J = 7.5$, 8.9 y 15.2, 3-H), 2.18 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.9 y 15.2, 3-H), 1.41 (d, 3H, $J = 7.1$, 1'- CH_3), 1.34 (s, 9H, ^tBu). ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): Proporción de rotámeros (4.6:1) δ rotámero mayoritario 8.14 (d, 1H, $J = 7.7$, 1'-NH), 7.81 (d ancho, 1H, $J = 7.6$, NH^tBu), 7.46-7.13 (m, 10H, *Ph*), 5.23 (d, 1H, $J = 12.4$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.06 (d, 1H, $J = 12.4$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.29 (m, 1H, 1'-H), 3.50 (m, 1H, 4-H), 3.36 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.98 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.79 (m, 1H, 4-H), 2.30 (m, 1H, 3-H), 2.11 (m, 1H, 3-H), 1.25 (s, 9H, ^tBu), 1.23 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'- CH_3). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ rotámero mayoritario: 174.2, 170.9 (CONH), 156.3 (1-CO), 136.1, 134.8 (C-Ar), 130.4, 128.6, 128.4, 127.1 (CH-Ar), 73.5 (2-C), 67.0 ($\text{CH}_2\text{-Z}$), 51.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 49.7 (1'-C), 44.8 (4-C), 38.8 (2- CH_2), 28.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.7 (3-C), 17.2 (1'- CH_3). EM (ES modo positivo): 452.2 $[\text{M}+1]^+$, 474.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. (%) Cal. para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$: C 69.16, H 7.37, N 9.31, Exp: C 68.94, H 7.42, N 9.28

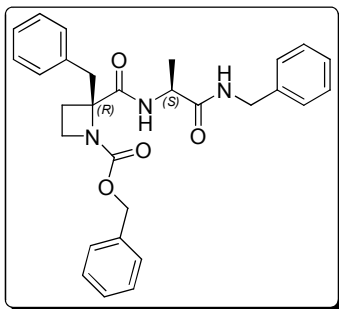
(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-bencilcarbamoil)etil]carbamoil azetidina ((*S,S*)-1.40b)



Aceite viscoso. Rdto: 56%. $[\alpha]_D = +16.8$ (c 1, CHCl_3). HPLC: $t_R = 44.48$ min (A:B = 43:57). ^1H RMN (CDCl_3) Proporción de rotámeros (7.5:1) δ rotámero mayoritario: 8.29 (d, 1H, $J = 7.2$, 1'-NH), 7.43-7.05 (m, 15H, *Ph*), 6.82 (m, 1H, NH^tBu), 5.27 (d, 1H, $J = 12.2$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.05 (d, 1H, $J = 12.2$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.54-4.37 (m, 3H, 1'-H y NCH_2Ph), 3.48 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.8 y 12.7, 4-H), 3.40 (d, 1H, $J = 14.0$, 2- CH_2), 2.86 (m, 1H, 4-H), 2.80 (d, 1H, $J = 14.0$, 2- CH_2), 2.56 (ddd, 1H, $J = 7.4$,

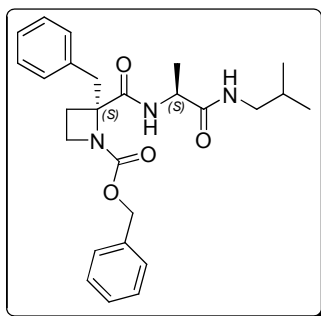
8.8 y 15.1, 3-*H*), 2.13 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.9 y 15.1, 3-*H*), 1.44 (d, 3H, $J = 7.2$, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros (4.8:1) δ rotámero mayoritario 8.41 (m, 1H, NHBn), 8.31 (d, 1H, $J = 7.7$, 1'-NH), 7.43-7.10 (m, 15H, Ph), 5.22 (d, 1H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 5.01 (d, 1H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 4.39 (m, 1H, 1'-H), 4.32 (m, 2H, NCH₂Ph), 3.54 (m, 1H, 4-*H*), 3.35 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 3.01 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 2.83 (m, 1H, 4-*H*), 2.32 (m, 1H, 3-*H*), 2.09 (m, 1H, 3-*H*), 1.30 (d, 3H, $J = 6.9$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (CDCl₃) δ rotámero mayoritario: 174.2, 171.7 (CONH), 156.3 (1-CO), 138.2, 136.1, 134.7 (C-Ar), 130.3, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 127.6, 127.3, 127.0 (CH-Ar), 73.3 (2-C), 67.0 (CH₂-Z), 49.1 (1'-C), 44.8 (4-C), 43.4 (NCH₂Ph), 38.9 (2-CH₂), 23.3 (3-C), 17.1 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 486.2 [M+1]⁺, 508.2 [M+Na]⁺. Anal. (%) Cal. para C₂₉H₃₁N₃O₄: C 71.73, H 6.43, N 8.65 Exp: C 71.50, H 6.52, N 8.41.

(2*R*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-bencilcarbamoil)etil]carbamoil azetidina ((*R,S*)-1.40b)



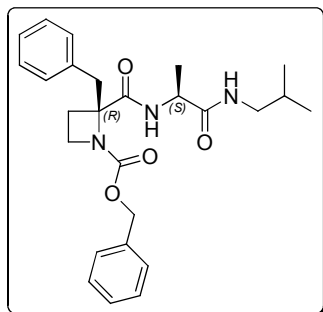
Aceite viscoso. Rdto: 26 %. $[\alpha]_D = -42.2$ (c 0.68, CHCl₃). HPLC: $t_R = 41.49$ min (A:B = 43:57). ¹H RMN (CDCl₃) Proporción de rotámeros (4.3:1) δ rotámero mayoritario: 8.29 (d, 1H, $J = 7.2$, 1'-NH), 7.43-7.05 (m, 15H, Ph), 6.76 (m, 1H, NHBn), 5.30 (d, 1H, $J = 12.2$, CH₂-Z), 4.97 (d, 1H, $J = 12.2$, CH₂-Z), 4.56-4.38 (m, 3H, 1'*H* y NCH₂Ph), 3.49 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 3.40 (m, 1H, 4-*H*), 2.92 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 2.84 (dd, 1H, $J = 8.7$, 16.6, 4-*H*), 2.46 (m, 1H, 3-*H*), 2.13 (m, 1H, 3-*H*), 1.49 (d, 3H, $J = 7.2$, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros (1.7:1) δ rotámero mayoritario 8.47 (m, 1H, NHBn), 8.17 (d, 1H, $J = 7.3$, 1'-NH), 7.42-7.11 (m, 15H, Ph), 5.22 (d, 1H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 5.00 (d, 1H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 4.44-4.24 (m, 3H, 1'*H* y NCH₂Ph), 3.51 (m, 1H, 4-*H*), 3.37 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 3.00 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 2.79 (m, 1H, 4-*H*), 2.33 (m, 1H, 3-*H*), 2.09 (m, 1H, 3-*H*), 1.31 (d, 3H, $J = 6.9$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (CDCl₃) δ rotámero mayoritario: 174.4, 171.7 (CONH), 156.4 (1'-CO), 138.3, 136.1, 134.7 (C-Ar), 130.4, 128.6, 128.5, 128.4, 127.4, 127.3, 127.1 (CH-Ar), 73.4 (2-C), 67.1 (CH₂-Z), 49.1 (1'-C), 44.8 (4-C), 43.4 (NCH₂Ph), 39.0 (2-CH₂), 23.5 (3-C), 17.0 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 486.2 [M+1]⁺, 508.2 [M+Na]⁺. Anal. (%) Cal. para C₂₉H₃₁N₃O₄: C 71.73, H 6.43, N 8.65 Exp: C 71.81, H 6.51, N 8.52.

(2S,1'S)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-isobutylcarbamoyl)etil]carbamoyl azetidina ((S,S)-1.40c)



Espuma. Rdto: 60 %. $[\alpha]_D = +14.7$ (c 0.5, CHCl_3). HPLC: $t_R = 22.29$ min (A:B = 47:53). ^1H RMN (CDCl_3) Proporción de rotámeros (6.4:1) δ rotámero mayoritario: 8.24 (d, 1H, $J = 7.4$, 1'-NH), 7.39-7.08 (m, 10H, Ph), 6.51 (m, 1H, NH^iBu), 5.29 (d, 1H, $J = 12.2$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.08 (d, 1H, $J = 12.2$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.43 (m, 1H, 1'-H), 3.50 d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 3.48 (m, 1H, 4-H), 3.08 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}^i\text{Bu}$), 2.94 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.86 (dd, 1H, $J = 8.9$, 16.3, 4-H), 2.58 (ddd, 1H, $J = 7.5$, 8.9 y 15.2, 3-H), 2.18 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.9 y 15.2, 3-H), 1.76 (m, 1H, $\text{CH-}^i\text{Bu}$), 1.41 (d, 3H, $J = 7.2$, 1'- CH_3), 0.90 (d, 6H, $J = 6.7$, $\text{CH}_3\text{-}^i\text{Bu}$). ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): Proporción de rotámeros (2.8:1) δ rotámero mayoritario 8.29 (d, 1H, $J = 7.3$, 1'-NH), 7.85 (m, 1H, NH^iBu), 7.44-7.10 (m, 10H, Ph), 5.25 (d, 1H, $J = 12.4$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.04 (d, 1H, $J = 12.4$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.34 (m, 1H, 1'-H), 3.54 (m, 1H, 4-H), 3.31 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 3.01 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.95 (m, 1H, 4-H), 2.84 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}^i\text{Bu}$), 2.32 (m, 1H, 3-H), 2.01 (m, 1H, 3-H), 1.72 (m, 1H, $\text{CH-}^i\text{Bu}$), 1.26 (d, 3H, $J = 7.1$, 1'- CH_3), 0.85 (d, 6H, $J = 6.6$, $\text{CH}_3\text{-}^i\text{Bu}$). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ rotámero mayoritario: 174.2, 171.7 (CONH), 156.3 (1-CO), 136.1, 134.7 (C-Ar), 130.4, 128.6, 128.4, 127.1 (CH-Ar), 73.4 (2-C), 67.1 ($\text{CH}_2\text{-Z}$), 49.2 (1'-C), 46.8 ($\text{CH}_2\text{-}^i\text{Bu}$), 44.8 (4-C), 38.9 (2- CH_2), 28.4 ($\text{CH-}^i\text{Bu}$), 23.4 (3-C), 20.1 ($\text{CH}_3\text{-}^i\text{Bu}$), 17.2 (1'- CH_3). EM (ES modo positivo): 452.3 $[\text{M}+1]^+$, 474.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. (%) Cal. para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$: C 69.16, H 7.37, N 9.31 Exp: C 68.91, H 7.43, N 9.15.

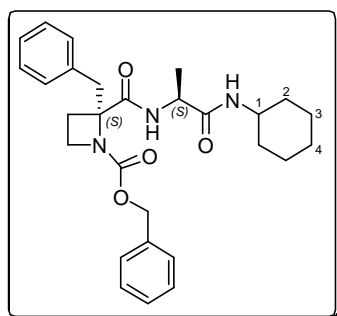
(2R,1'S)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-isobutylcarbamoyl)etil]carbamoyl azetidina ((R,S)-1.40c)



Espuma. Rdto: 25%. HPLC: $t_R = 19.63$ min (A:B = 47:53). ^1H RMN (CDCl_3) Proporción de diastereoisómeros ((R,S): (S,S) 3.2:1) Diastereoisómero mayoritario Proporción de rotámeros (5.4:1) δ rotámero mayoritario: 8.27 (d, 1H, $J = 7.3$, 1'-NH), 7.40-7.09 (m, 10H, Ph), 6.45 (m, 1H, NH^iBu), 5.33 (d, 1H, $J = 12.3$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.02 (d, 2H, $J = 12.3$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.46 (m, 1H, 1'-H), 3.51 (d, 1H, $J = 13.8$, 2- CH_2), 3.46 (m, 1H, 4-H), 3.09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}^i\text{Bu}$), 2.94 (d, 1H, $J = 13.8$, 2- CH_2), 2.86 (dd, 1H, $J = 8.1$,

16.1, 4-*H*), 2.55 (ddd 1H, $J = 8.1, 9.5$ y 15.2 , 3-*H*), 2.18 (ddd, 1H, $J = 4.5, 8.1$ y 15.2 , 3-*H*), 1.77 (m, 1H, CH-*i*Bu), 1.45 (d, 3H, $J = 7.1$, 1'-CH₃), 0.90 (d, 3H, $J = 6.7$, CH₃-*i*Bu), 0.89 (d, 3H, $J = 6.7$, CH₃-*i*Bu). ¹³C RMN (CDCl₃) δ rotámero mayoritario: 174.4, 171.8 (CONH), 156.4 (1-CO), 136.1, 134.7 (C-Ar), 130.4, 128.6, 128.4, 127.1 (CH-Ar), 73.5 (2-C), 67.1 (CH₂-Z), 49.2 (1'-C), 46.7 (CH₂-*i*Bu), 44.8 (4-C), 39.0 (2-CH₂), 28.4 (CH-*i*Bu), 23.6 (3-C), 19.9 (CH₃-*i*Bu), 16.9 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 452.3 [M+1]⁺, 474.3 [M+Na]⁺. Anal. (%) Cal. para C₂₆H₃₃N₃O₄: C 69.16, H 7.37, N 9.31 Exp: C 68.75, H 7.43, N 9.12.

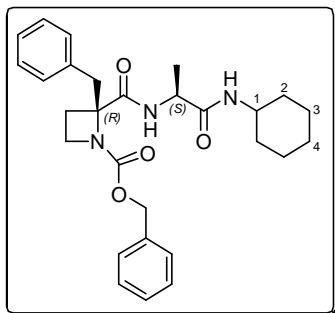
(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-ciclohexilcarbamoil)etil]carbamoil azetidina ((*S,S*)-1.40d)



Espuma. Rdto: 52%. $[\alpha]_D = +16.9$ (c 0.91, CHCl₃). HPLC: $t_R = 34.88$ min (A:B = 47:53). ¹H RMN (CDCl₃) Proporción de rotámeros (6.3:1) δ rotámero mayoritario: 8.23 (d, 1H, $J = 7.4$, 1'-NH), 7.47-7.10 (m, 10H, Ph), 6.36 (d, 1H, $J = 8.0$, NH-Chx), 5.30 (d, 2H, $J = 12.2$, CH₂-Z), 5.08 (d, 1H, $J = 12.2$, CH₂-Z), 4.41 (m, 1H, 1'-H), 3.75 (m, 1H, 1-H Chx), 3.50 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 3.48 (m, 1H, 4-H), 2.92 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 2.83 (dd, 1H, $J = 8.8, 16.3$, 4-H), 2.57 (ddd, 1H, $J = 7.5, 8.8$ y 15.2 , 3-H), 2.17 (ddd, 1H, $J = 4.6, 8.8$ y 15.2 , 3-H), 1.87 (m, 2H, 2-H Chx), 1.69 (m, 2H, 3-H Chx), 1.59 (m, 1H, 4-H Chx), 1.40 (d, 3H, $J = 7.2$, 1'-CH₃), 1.38 (m, 2H, 2-H Chx), 1.26 (m, 1H, 4-H Chx), 1.18 (m, 2H, 3-H Chx). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros (3.4:1) δ rotámero mayoritario 8.24 (d, 1H, $J = 7.7$, 1'-NH), 7.79 (d, 1H, $J = 7.6$, NH-Chx), 7.44-7.11 (m, 10H, Ph), 5.25 (d, 2H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 5.04 (d, 1H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 4.30 (m, 1H, 1'-H), 3.53 (m, 2H, 1-H Chx, 4-H), 3.37 (d, 1H, $J = 13.7$, 2-CH₂), 3.01 (d, 1H, $J = 13.7$, 2-CH₂), 2.83 (m, 1H, 4-H), 2.31 (m, 1H, 3-H), 2.10 (m, 1H, 3-H), 1.69 (m, 5H, 2-H Chx, 3-H Chx), 1.54 (m, 2H, 2-H Chx, 3-H Chx), 1.24 (d, 3H, $J = 7.2$, 1'-CH₃), 1.16 (m, 2H, 2-H Chx, 4-H Chx), 0.85 (m, 1H, 4-H Chx). ¹³C RMN (CDCl₃) δ rotámero mayoritario: 174.1, 170.7 (CONH), 156.3 (1-CO), 136.1, 134.7 (C-Ar), 130.4, 128.5, 128.4, 128.3, 127.1 (CH-Ar), 73.4 (2-C), 67.0 (CH₂-Z), 49.1 (1'-C), 48.0 (1-C Chx), 44.8 (4-C), 38.3 (2-CH₂), 32.9, 32.6 (2-C Chx), 25.5 (4-C Chx), 24.7 (3-C Chx), 23.3 (3-C), 17.2 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 478.3 [M+1]⁺,

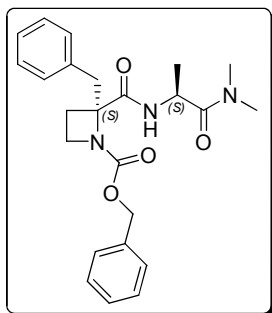
500.3 $[M+Na]^+$. Anal. (%) Cal. para $C_{28}H_{35}N_3O_4$: C 70.42, H 7.39, N 8.80, Exp: C 70.32, H 7.46, N 8.72.

(2R,1'S)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-ciclohexilcarbamoil)etil]carbamoil azetidina ((R,S)-1.40d)



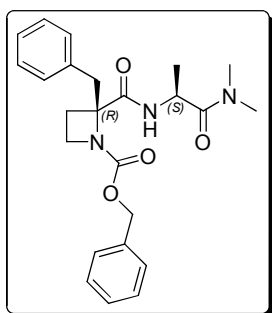
Espuma. Rdto: 23%. $[\alpha]_D = -49.5$ (c 0.63, $CHCl_3$). HPLC: $t_R = 31.20$ min (A:B = 47:53). 1H RMN ($CDCl_3$) Proporción de rotámeros (5.8:1) δ rotámero mayoritario: 8.20 (d, 1H, $J = 7.4$, 1'-NH), 7.46-7.05 (m, 10H, Ph), 6.25 (d, 1H, $J = 7.1$, NH-Chx), 5.34 (d, 1H, $J = 12.2$, CH_2-Z), 5.02 (d, 2H, $J = 12.2$, CH_2-Z), 4.42 (m, 1H, 1'-H), 3.75 (m, 1H, 1-H Chx), 3.51 (d, 1H, $J = 14.0$, 2- CH_2), 3.46 (m, 1H, 4-H), 2.95 (d, 1H, $J = 14.0$, 2- CH_2), 2.86 (dd, 1H, $J = 8.8$, 16.2, 4-H), 2.53 (ddd 1H, $J = 7.5$, 8.8 y 15.2, 3-H), 2.18 (ddd, 1H, $J = 4.6$, 8.8 y 15.2, 3-H), 1.86 (m, 2H, 2-H Chx), 1.67 (m, 2H, 3-H Chx), 1.57 (m, 1H, 4-H Chx), 1.44 (d, 3H, $J = 7.2$, 1'- CH_3), 1.35 (m, 2H, 2-H Chx), 1.22 (m, 1H, 4-H Chx), 1.16 (m, 2H, 3-H Chx). 1H RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$): Proporción de rotámeros (2.2:1) δ rotámero mayoritario 8.10 (d, 1H, $J = 7.7$, 1'-NH), 7.79 (d, 1H, $J = 7.6$, NH-Chx), 7.43-7.12 (m, 10H, Ph), 5.23 (d, 1H, $J = 12.4$, CH_2-Z), 5.03 (d, 2H, $J = 12.4$, CH_2-Z), 4.29 (m, 1H, 1'-H), 3.52 (m, 3H, 1-H Chx, 2- CH_2 , 4-H), 2.99 (d, 1H, $J = 13.5$, 2- CH_2), 2.80 (m, 1H, 4-H), 2.31 (m, 1H, 3-H), 2.09 (m, 1H, 3-H), 1.69 (m, 4H, 2-H Chx), 1.55 (m, 2H, 3-H Chx), 1.27-1.12 (m, 4H, 3-H Chx, 4-H Chx), 1.24 (d, 3H, $J = 6.9$, 1'- CH_3). ^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ rotámero mayoritario: 174.2, 170.8 (CONH), 156.3 (1'-CO), 136.1, 134.7 (C-Ar), 130.4, 128.6, 128.4, 128.3, 127.1 (CH-Ar), 73.5 (2-C), 67.0 (CH_2-Z), 49.2 (1'-C), 47.9 (1-C Chx), 44.8 (4-C), 38.9 (2- CH_2), 32.8, 32.7 (2-C Chx), 25.5 (4-C Chx), 24.6, 24.5 (3-C Chx), 23.7 (3-C), 17.2 (1'- CH_3). EM (ES modo positivo): 478.3 $[M+1]^+$, 500.3 $[M+Na]^+$. Anal. (%) Cal. para $C_{28}H_{35}N_3O_4$: C 70.42, H 7.39, N 8.80. Exp: C 70.33, H 7.45, N 8.73.

**(2S,1'S)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-dimetilcarbamoil)etil]carbamoil
azetidina ((S,S)-1.40e)**



Aceite viscoso. Rdto: 64%. $[\alpha]_D = +86.0$ (*c* 0.6, CHCl_3). HPLC: $t_R = 29.31$ min (A:B = 37:63). ^1H RMN (CDCl_3) Proporción de rotámeros: 3.5:1 δ rotámero mayoritario: 8.67 (d, 1H, $J = 6.7$, 1'-NH), 7.51-6.98 (m, 10H, Ph), 5.40 (d, 1H, $J = 12.3$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.04 (d, 1H, $J = 12.3$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.90 (m, 1H, 1'-H), 3.59 (d, 1H, $J = 14.0$, 2- CH_2), 3.47 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.1 y 15.9, 4-H), 3.09 (s, 3H, NCH_3), 3.00 (s, 3H, NCH_3), 2.90 (d, 1H, $J = 14.0$, 2- CH_2), 2.80 (dd, 1H, $J = 8.1$, 15.9, 4-H), 2.53 (ddd 1H, $J = 8.1$, 11.3 y 15.2, 3-H), 2.15 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.1 y 15.2, 3-H), 1.38 (d, 3H, $J = 7.1$, 1'- CH_3). ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): Proporción de rotámeros: 2.2:1 δ rotámero mayoritario 8.26 (d, 1H, $J = 7.7$, 1'-NH), 7.41-7.11 (m, 10H, Ph), 5.23 (d, 1H, $J = 12.4$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.05 (d, 1H, $J = 12.4$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.75 (m, 1H, 1'-H), 3.52 (m, 1H, 4-H), 3.35 (d, 1H, $J = 13.6$, 2- CH_2), 3.03 (s, 3H, NCH_3), 2.98 (d, 1H, $J = 13.6$, 2- CH_2), 2.87 (s, 3H, NCH_3), 2.80 (m, 1H, 4-H), 2.30 (m, 1H, 3-H), 2.10 (m, 1H, 3-H), 1.21 (d, 3H, $J = 6.6$, 1'- CH_3). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ rotámero mayoritario: 173.3, 171.9 (CONH), 156.0 (1-CO), 136.4, 135.2 (C-Ar), 130.6, 128.4, 128.3, 128.2, 126.8 (CH-Ar), 73.4 (2-C), 66.8 ($\text{CH}_2\text{-Z}$), 45.7 (1'-C), 44.7 (4-C), 38.6 (2- CH_2), 36.9, 35.8 (NCH_3), 23.4 (3-C), 18.4 (1'- CH_3). EM (ES modo positivo): 424.2 $[\text{M}+1]^+$, 446.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. (%) Cal. para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$: C 68.06, H 6.90, N 9.92, Exp: C 68.15, H 7.01, N 9.83.

**(2R,1'S)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-dimetilcarbamoil)etil]carbamoil
azetidina ((R,S)-1.40e)**



Aceite viscoso. Rdto: 31 %. $[\alpha]_D = -17.6$ (*c* 0.79, CHCl_3). HPLC: $t_R = 26.51$ min (A:B = 37:63). ^1H RMN (CDCl_3) Proporción de rotámeros: 11.5:1 δ rotámero mayoritario: 8.43 (d, 1H, $J = 7.1$, 1'-NH), 7.49-7.03 (m, 10H, Ph), 5.40 (d, 1H, $J = 12.3$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 5.01 (d, 1H, $J = 12.3$, $\text{CH}_2\text{-Z}$), 4.94 (m, 1H, 1'-H), 3.57 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 3.46 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 11 y 16.1, 4-H), 3.11 (s, 3H, NCH_3), 3.00 (s, 3H, NCH_3), 2.96 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.81 (dd, 1H, $J = 8.1$, 16.1, 4-H), 2.48 (ddd 1H, $J = 8.1$, 11 y 15.2, 3-H), 2.15 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.1 y 15.2, 3-H), 1.40 (d, 3H, $J = 7.4$, 1'- CH_3). ^1H RMN

(300 MHz, DMSO- d_6): Proporción de rotámeros: 2.1:1 δ rotámero mayoritario 8.22 (d, 1H, $J = 7.6$, 1'-NH), 7.45-7.11 (m, 10H, Ph), 5.24 (d, 1H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 5.04 (d, 1H, $J = 12.4$, CH₂-Z), 4.77 (m, 1H, 1'-H), 3.50 (m, 1H, 4-H), 3.37 (d, 1H, $J = 13.5$, 2-CH₂), 3.02 (s, 3H, NCH₃), 3.00 (d, 1H, $J = 13.5$, 2-CH₂), 2.85 (s, 3H, NCH₃), 2.82 (m, 1H, 4-H), 2.31 (m, 1H, 3-H), 2.13 (m, 1H, 3-H), 1.24 (d, 3H, $J = 6.6$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (CDCl₃) δ rotámero mayoritario: 173.2, 172.0 (CONH), 156.0 (1-CO), 136.4, 135.2 (C-Ar), 130.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 126.9 (CH-Ar), 73.4 (2-C), 66.8 (CH₂-Z), 45.4 (1'-C), 44.7 (4-C), 38.6 (2-CH₂), 37.0, 35.8 (NCH₃), 23.6 (3-C), 18.3 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 424 [M+1]⁺, 446 [M+Na]⁺. Anal. (%) Cal. para C₂₄H₂₉N₃O₄: C 68.06, H 6.90, N 9.92, Exp: C 68.12, H 6.98, N 9.87.

1.6.3. Síntesis en fase sólida de derivados modificados en la cadena lateral del aminoácido C-terminal (serie B) y en el sustituyente del nitrógeno azetidínico (serie C)

1.6.3.1 Métodos analíticos

Test de ninhidrina⁷²

El test de ninhidrina o test de Kaiser se emplea para evaluar cualitativamente la presencia de aminas primarias libres sobre un polímero y, por lo tanto, se utiliza como control de la extensión de cualquier reacción que conlleve la transformación química de dichos grupos amino.

Procedimiento general: A una alícuota de resina seca (3-4 mg) se le añaden 6 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B, calentándose la mezcla a 110 °C durante 3 min. Una coloración azul o azul-verdosa de la resina o del sobrenadante indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica ausencia de aminas primarias (ensayo negativo).

Reactivo A: Se disuelven 40 mg de fenol en 10 ml de EtOH absoluto en caliente. Por otro lado se prepara una disolución de 65 mg de KCN en 100 ml de H₂O y se diluyen 2 ml de esta disolución en 100 ml de piridina recién destilada sobre ninhidrina. Ambas disoluciones se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 min. Seguidamente se filtran y se mezclan los dos filtrados.

Reactivo B: Disolución de ninhidrina (2.5 g) en EtOH absoluto (50 ml). La disolución se almacena protegida de la luz, preferiblemente bajo atmósfera inerte.

Test del cloranilo⁷³

El test del cloranilo se utiliza para evaluar la extensión de cualquier transformación química llevada a cabo sobre aminas secundarias.

Procedimiento general: A una alícuota, 0.5-2.0 mg de resina lavada y seca, se adicionan 2 gotas del reactivo A y 2 gotas del reactivo B, agitándose la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. Una coloración azul-verdosa de la resina (ensayo positivo)

indica la existencia de aminas secundarias libres, mientras que una coloración amarilla (ensayo negativo) indica la ausencia de éstas

Reactivo A: Disolución de acetaldehído (1 ml) en DMF (49 ml). La disolución se almacena a 4°C en un recipiente protegido de la luz.

Reactivo B: Disolución de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) (1g) en DMF (49 ml). La disolución se almacena a 4°C.

1.6.3.2. Protocolos generales de síntesis en fase sólida

Aspectos generales

La síntesis en fase sólida de los productos descritos en este trabajo se ha llevado a cabo en jeringuillas de polipropileno provistas de un filtro de polietileno poroso, de volúmenes entre 2 y 50 ml dependiendo de la cantidad de resina de partida. Los reactivos o disolventes se añaden a la jeringuilla de manera que permitan un adecuado hinchamiento de la resina. La mezcla se agita con una varilla de teflón o mediante un agitador orbital y al final de cada tratamiento el disolvente, los excesos de reactivos y los subproductos que se encuentren en disolución, se eliminan por filtración a través de un sistema conectado a una trompa de vacío.

En este capítulo se ha empleado como soporte polimérico una resina Fmoc-Rink-amida (0.82 mmol/g). Antes de iniciar la síntesis se realiza el acondicionamiento e hinchado previo de la resina mediante lavados con DCM/DMF. El crecimiento de la cadena peptídica se realiza manualmente según el protocolo general de síntesis Fmoc/Bu. Los aminoácidos comerciales utilizados fueron: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Glu(^tBu)-OH. El grado de evolución de las reacciones fue monitorizado mediante el test de Kaiser para aminas primarias o el test de cloranilo para aminas secundarias, anteriormente descritos.

Procedimiento general para la eliminación del grupo protector Fmoc

La resina protegida con el grupo Fmoc se trata con una disolución al 20% de piperidina en DMF (1 x 1 min.) y (3 x 10 min.). Pasado este tiempo se lava con DMF/DCM/DMF/DCM/DMF (4 x 0.5 min.) dejando la resina acondicionada para la posterior operación de acoplamiento, como se describe a continuación.

Procedimiento general de acoplamiento en fase sólida

En un vial se disuelven 0.3 mmol del correspondiente aminoácido Fmoc-*N*-protegido y 0.3 mmol de HOBt en DMF anhidra (1ml). A continuación se añaden 0.3 mmol de DIC y la mezcla resultante se añade a una jeringa con 0.1 mmol de resina Rink amida, *N*-desprotegida e hinchada previamente, y se deja reaccionar durante unas 18 h. Tras este tiempo se elimina el exceso de reactivos mediante lavados con DMF/DCM/DMF/DCM (4 x 0.5 min.). Estos acoplamientos fueron monitorizados mediante el test de Kaiser de aminas primarias.

A continuación se elimina el grupo Fmoc del aminoácido correspondiente y se acopla el derivado de azetidina **1.36** o **1.37** siguiendo el procedimiento anteriormente explicado.

Procedimiento general para la acetilación de aminas

La resina **1.45** se trata con una disolución de Ac₂O:DMF:DIEA (1:1:1) (1 x 1 min.) y (4 x 10 min.). Pasado este tiempo se lava con DMF/DCM/DMF/DCM (4 x 0.5 min.).

Síntesis de los derivados *N*-sustituídos de la serie C

La resina **1.45**, tras la eliminación del grupo Fmoc en las condiciones señaladas, se hincha en DMF y se añade óxido de propileno (15 eq), (excepto en las reacciones con los isocianatos). Se enfría a 0°C y se añaden 10 eq del reactivo correspondiente (isocianato, cloroformiato o cloruro de acilo o sulfonilo). Se deja reaccionar durante unas 18 h. Tras este tiempo se elimina el exceso de reactivos mediante lavados con DMF/DCM/DMF/DCM (4 x 0.5 min.). Estos acoplamientos fueron monitorizados mediante el test de cloranilo de aminas secundarias.

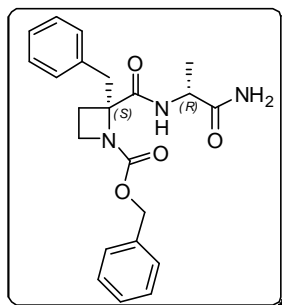
Desanclaje de los productos finales de la resina

Se tratan 200 mg de resina con 2 ml de una mezcla de TFA/H₂O/TIPS (95:4:1) a t.a. durante 3 h. Pasado este tiempo se lava la resina con DCM (3 x 3 ml) recogiendo los lavados en un matraz. Se elimina el disolvente a presión reducida y la mezcla resultante se liofiliza para dar lugar en cada caso a una mezcla de dos diastereoisómeros que se purificaron en columna de gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes indicado para cada caso particular.

Serie B: Derivados modificados en la cadena lateral del aminoácido C-terminal

(2*S*,1'*R*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoilazetidina

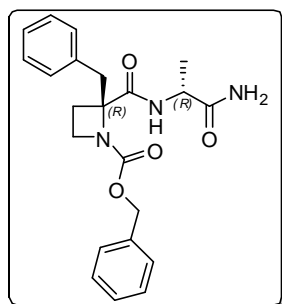
((*S*,*R*)-1.43a)



Espuma. Rdto. 70 %. Gradiente de 5 a 17 % de acetona en CH₂Cl₂. $[\alpha]_D = +20.0$ (*c* 1.3, CHCl₃). HPLC: $t_R = 8.72$ min. (A:B=35:65). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 8.2:1 δ rotámero mayoritario 8.28 (d, 1H, *J* = 6.8, 1'-NH), 7.37-7.10 (m, 10H, Ph), 6.29 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.31 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 5.28 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.08 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 4.46 (m, 1H, 1'-H), 3.51 (m, 2H, 2-CH₂ y 4-H), 2.95 (d, 1H, *J* = 14.0, 2-CH₂), 2.88 (m, 1H, 4-H), 2.54 (m, 1H, 3-H), 2.13 (m, 1H, 3-H), 1.47 (d, 3H, *J* = 6.9, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 2.2:1 δ rotámero mayoritario 8.06 (d, 1H, *J* = 7.2, 1'-NH), 7.41-7.13 (m, 11H, Ph, CONH₂), 7.05 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.23 (d, 1H, *J* = 12.5, CH₂-Z), 5.03 (d, 1H, *J* = 12.5, CH₂-Z), 4.28 (m, 1H, 1'-H), 3.49 (m, 1H, 4-H), 3.37 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.99 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.79 (m, 1H, 4-H), 2.30 (m, 1H, 3-H), 2.11 (m, 1H, 3-H), 1.16 (d, 3H, *J* = 6.7, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.4, 174.0 (CONH), 156.5 (1'-CO), 136.1, 134.6 (C Ar), 130.4, 128.6, 128.4, 128.3, 127.2 (CH Ar), 73.5 (2-C), 67.1 (CH₂-Z), 48.8 (1'-C), 44.9 (4-C), 39.1 (2-CH₂), 23.5 (3-C), 16.9 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 396.1 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₂H₂₅N₃O₄: C, 66.82; H, 6.37; N, 10.63. Exp: C, 66.73; H, 6.43; N, 10.55

(2*R*,1'*R*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoilazetidina

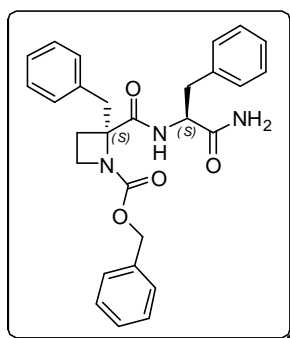
((*R*,*R*)-1.43a)



Espuma. Rdto. 23%. Gradiente de 5 a 17 % de acetona en CH₂Cl₂. $[\alpha]_D = -14.2$ (*c* 0.5, CHCl₃). HPLC: $t_R = 9.54$ min. (A:B=35:65). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 7.6:1 δ rotámero mayoritario 8.23 (d, 1H, *J* = 7.3, 1H, 1'-NH), 7.39-7.12 (m, 10H, Ph), 6.42 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.30 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.28 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 5.09 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 4.47 (m, 1H, 1'-H), 3.48 (m, 1H, 4-H), 3.49 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.99 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.89 (m,

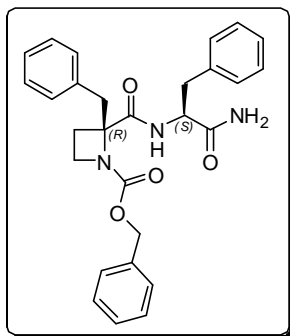
1H, 4-*H*), 2.59 (m, 1H, 3-*H*), 2.19 (m, 1H, 3-*H*), 1.42 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 3.4:1 δ rotámero mayoritario 8.21 (d, 1H, $J = 7.5$, 1'-NH), 7.43-7.13 (m, 11H, Ph, CONH₂), 7.09 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.24 (d, 1H, $J = 12.6$, CH₂-Z), 5.03 (d, 1H, $J = 12.6$, CH₂-Z), 4.28 (m, 1H, 1'-*H*), 3.51 (m, 1H, 4-*H*), 3.29 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 3.00 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 2.80 (m, 1H, 4-*H*), 2.29 (m, 1H, 3-*H*), 2.07 (m, 1H, 3-*H*), 1.25 (d, 3H, $J = 6.9$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.1 (CONH), 156.4 (1-CO), 136.1, 134.6 (C Ar), 130.4, 128.6, 128.4, 128.3, 127.2 (CH Ar), 73.4 (2-C), 67.2 (CH₂-Z), 48.7 (1'-C), 44.9 (4-C), 39.0 (2-CH₂), 23.6 (3-C), 16.9 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 396.1 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₂H₂₅N₃O₄: C, 66.82; H, 6.37; N, 10.63. Exp: C, 66.71; H, 6.42; N, 10.58.

(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-carbamoil-2'-fenil)etil]carbamoil azetidina ((*S,S*)-1.43b)



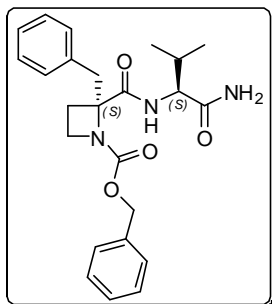
Aceite viscoso. Rdto. 67 %. Eluyente: 20:1 CH₂Cl₂:Acetona. [α]_D = +3.9 (c 0.7, CHCl₃). HPLC: *t*_R = 19.15 min. (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 5.6:1 δ rotámero mayoritario 7.88 (d, 1H, $J = 9.2$, 1'-NH), 7.32-7.09 (m, 15H, Ar), 6.16 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.30 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.18 (d, 1H, $J = 12.1$, CH₂-Z), 4.94 (d, 1H, $J = 12.1$, CH₂-Z), 4.65 (m, 1H, 1'-*H*), 3.36 (d, 1H, $J = 14.1$, 2-CH₂), 3.24 (m, 1H, 4-*H*), 3.20 (m, 1H, 2'-*H*), 2.98 (dd, 1H, $J = 8.8$ y 13.9, 2'-*H*), 2.88 (d, 1H, $J = 14.1$, 1H, 2-CH₂), 2.76 (m, 1H, 4-*H*), 2.23 (m 1H, 3-*H*), 2.04 (m, 1H, 3-*H*). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 3.2:1 δ rotámero mayoritario 8.17 (d, 1H, $J = 9.0$, 1'-NH), 7.41 (s ancho, 1H, CONH₂), 7.39-7.07 (m, 16H, Ar, CONH₂), 5.24 (d, 1H, $J = 12.6$, CH₂-Z), 4.01 (d, 1H, $J = 12.6$, CH₂-Z), 4.56 (m, 1H, 1'-*H*), 3.49 (m, 1H, 4-*H*), 3.36-3.05 (m, 2H, 2'-*H*, 2-CH₂), 2.98-2.89 (m, 3H, 2'-*H*, 2-CH₂, 4-*H*), 2.86 (m 1H, 3-*H*), 2.71 (m, 1H, 3-*H*). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 173.9, 173.1 (CONH), 156.0 (1-CO), 136.8, 136.0, 134.7 (C Ar), 130.4, 129.3, 128.9, 128.7, 127.1, 126.8 (CH Ar), 73.3 (2-C), 67.0 (CH₂-Z), 53.9 (1'-C), 44.8 (4-C), 38.6 (2-CH₂), 37.3 (2'-C), 23.8 (3-C). EM (ES modo positivo): 472.2 [M+1]⁺, 494.2 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₈H₂₉N₃O₄: C, 71.32; H, 6.20; N, 8.91. Exp: C, 71.38; H, 6.14; N, 8.86.

(2*R*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-carbamoil-2'-fenil)etil]carbamoil azetidina ((*R,S*)-1.43b)



Aceite viscoso. Rdto. 30 %. Eluyente: 20:1 CH₂Cl₂:Acetona. $[\alpha]_D = +10.2$ (*c* 0.9, CHCl₃). HPLC: $t_R = 17.81$ min. (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 4.5:1 δ rotámero mayoritario 8.43 (d, 1H, *J* = 7.5, 1'-NH), 7.31-7.00 (m, 15H, Ph), 6.24 (s ancho, 1H, CONH₂), 6.10 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.29 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 5.03 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 4.64 (m, 1H, 1'-H), 3.53 (m, 1H, 4-H), 3.16 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 3.08 (m, 1H, 2'-H), 2.93 (m, 1H, 2'-H), 2.62 (m, 1H, 4-H), 2.67 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.57 (m, 1H, 3-H), 2.12 (m, 1H, 3-H). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 2.4:1 δ rotámero mayoritario 8.06 (d, 1H, *J* = 9.0, 1'-NH), 7.52 (s ancho, 1H, CONH₂), 7.47-7.15 (m, 16H, Ar, CONH₂), 5.17 (d, 1H, *J* = 12.5, CH₂-Z), 4.12 (d, 1H, *J* = 12.5, CH₂-Z), 4.47 (m, 1H, 1'-H), 3.52 (m, 1H, 4-H), 3.48-3.25 (m, 5H, 2'-H, 2-CH₂, 4-H), 2.76 (m, 1H, 3-H), 2.68 (m, 1H, 3-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 173.4, 173.7 (CONH), 155.7 (1-CO), 137.2, 136.4, 133.8 (*C* Ar), 130.3, 129.6, 128.8, 128.3, 127.4, 127.2 (CH Ar), 73.4 (2-C), 67.2 (CH₂-Z), 53.7 (1'-C), 44.9 (4-C), 38.7 (2-CH₂), 37.5 (2'-C), 23.6 (3-C). EM (ES modo positivo): 472.2 [M+1]⁺, 494.2 [M+Na]⁺. Anal Calc. para C₂₈H₂₉N₃O₄: C, 71.32; H, 6.20; N, 8.91. Exp: C, 71.41; H, 6.26; N, 8.86.

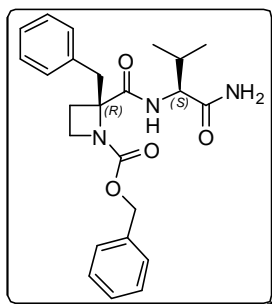
(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-carbamoil-2'-metil)propil]carbamoil azetidina ((*S,S*)-1.43c)



Aceite viscoso. Rdto. 62 %. Gradiente de 5 a 17% de acetona en CH₂Cl₂. $[\alpha]_D = +18.6$ (*c* 1.4, CHCl₃). HPLC: $t_R = 21.84$ min. (A:B = 35:65). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 6.7:1 δ rotámero mayoritario 8.19 (d, 1H, *J* = 8.1, 1'-NH), 7.38-7.14 (m, 10H, Ph), 6.16 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.43 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.25 (d, 1H, *J* = 12.2, CH₂-Z), 5.14 (d, 1H, *J* = 12.2, CH₂-Z), 4.27 (m, 1H, 1'-H), 3.53 (d, 1H, *J* = 14.1, 2-CH₂), 3.06 (m, 1H, 4-H), 3.02 (d, 1H, *J* = 14.1, 2-CH₂), 2.93 (m, 1H, 4-H), 2.60 (m, 1H, 3-H), 2.35 (m, 1H, 2'-H), 2.20 (m, 1H, 3-H), 0.95 (d, 3H, *J* = 6.8, 2'-CH₃), 0.90 (d, 3H, *J* = 6.8, 3'-H). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 2.2:1 δ

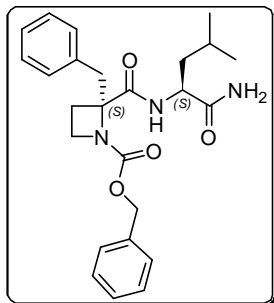
rotámero mayoritario 8.09 (d, 1H, $J = 8.7$, 1'-NH), 7.38-7.21 (m, 11H, Ph, CONH₂), 7.15 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.19 (d, 1H, $J = 12.6$, CH₂-Z), 5.11 (d, 1H, $J = 12.6$, CH₂-Z), 4.20 (m, 1H, 1'-H), 3.54 (m, 1H, 4-H), 3.35 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 3.02 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 2.98 (m, 1H, 4-H), 2.47 (m, 1H, 3-H), 2.14 (m, 1H, 2'-H), 2.09 (m, 1H, 3-H), 0.83 (d, 3H, $J = 6.9$, 2'-CH₃), 0.79 (d, 3H, $J = 6.7$, 3'-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.2, 173.4 (CONH), 156.3 (1-CO), 136.1, 134.7 (C Ar), 130.4, 129.3, 128.8, 128.5, 128.4, 127.1 (CH Ar), 73.6 (2-C), 67.1 (CH₂-Z), 58.5 (1'-C), 44.8 (4-C), 38.9 (2-CH₂), 29.6 (2'-C), 23.7 (3-C), 19.4 (2'-CH₃), 17.4 (3'-C). EM (ES modo positivo): 424.2 [M+1]⁺, 446.3 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₄H₂₉N₃O₄: C, 68.06; H, 6.90; N, 9.92. Exp: C, 68.15; H, 6.81; N, 9.86.

(2R,1'S)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-(1'-carbamoil-2'metil)propil]carbamoil azetidina ((R,S)-1.43c)



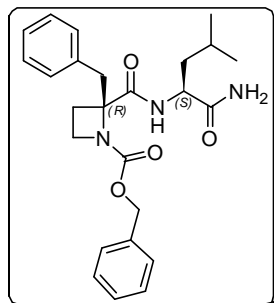
Aceite viscoso. Rdto. 24 %. Gradiente de 5 a 17% de acetona en CH₂Cl₂. [α]_D = -9.3 (c 1.2, CHCl₃) HPLC: t_R = 19.84 min. (A:B = 35:65). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 5.2:1 δ rotámero mayoritario 8.41 (d, 1H, $J = 8.3$, 1'-NH), 7.38-7.26 (m, 10H, Ph), 6.12 (s ancho, 1H, CONH₂), 6.01 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.28 (d, 1H, $J = 12.2$, CH₂-Z), 5.10 (d, 1H, $J = 12.2$, CH₂-Z), 4.31 (m, 1H, 1'-H), 3.56 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 3.49 (m, 1H, 4-H), 2.95 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 2.87 (m, 1H, 4-H), 2.62 (m, 1H, 3-H), 2.35 (m, 1H, 2'-H), 2.17 (m, 1H, 3-H), 1.04 (d, 3H, $J = 6.8$, 2'-CH₃), 1.03 (d, 3H, $J = 6.8$, 3'-H). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 2.5:1 δ rotámero mayoritario 7.88 (d, 1H, $J = 8.7$, 1'-NH), 7.48 (s ancho, 1H, CONH₂), 7.38-7.10 (m, 10H, Ph), 7.07 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.25 (d, 1H, $J = 12.3$, CH₂-Z), 5.06 (d, 1H, $J = 12.3$, CH₂-Z), 4.21 (m, 1H, 1'-H), 3.45 (m, 1H, 4-H), 3.36 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 2.98 (d, 1H, $J = 13.9$, 2-CH₂), 2.78 (m, 1H, 4-H), 2.37 (m, 1H, 3-H), 2.16 (m, 2H, 2'-H, 3-H), 0.87 (d, 3H, $J = 6.6$, 2'-CH₃), 0.76 (d, 3H, $J = 6.8$, 3'-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.5, 173.7 (CONH), 157.8 (1-CO), 135.8, 134.9 (C Ar), 131.7, 129.8, 128.9, 128.3, 127.5 (CH Ar), 73.7 (2-C), 67.2 (CH₂-Z), 58.7 (1'-C), 44.9 (4-C), 39.2 (2-CH₂), 29.7 (2'-C), 23.3 (3-C), 19.6 (2'-CH₃), 17.5 (3'-C). EM (ES modo positivo): 424.2 [M+1]⁺, 446.3 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₄H₂₉N₃O₄: C, 68.06; H, 6.90; N, 9.92. Exp: C, 68.17; H, 7.01; N, 9.85.

(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxicarbonil-2-[(1'-carbamoil-3'-metil)butil]carbamoil azetidina ((*S,S*)-1.43d)



Aceite viscoso. Rdto. 61 %. Gradiente de 5% a 25% de acetona en CH₂Cl₂. [α]_D = +12.1 (*c* 1.4, CHCl₃). HPLC: *t*_R = 16.12 min. (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 5.8:1 δ rotámero mayoritario 8.03 (d, 1H, *J* = 7.9, 1'-NH), 7.32-7.06 (m, 10H, Ph), 6.34 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.37 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.19 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 5.05 (d, 1H, *J* = 12.3, CH₂-Z), 4.35 (m, 1H, 1'-H), 3.44 (m, 1H, 4-H), 3.43 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.94 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.84 (m, 1H, 4-H), 2.53 (m, 1H, 3-H), 2.13 (m, 1H, 3-H), 1.77 (m, 1H, 2'-H), 1.56 (m, 2H, 2'-H y 3'-H), 0.87 (d, 3H, *J* = 6.2, 3'-CH₃), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.2, 4'-H). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 3:1 δ rotámero mayoritario 8.17 (d, 1H, *J* = 8.4, 1'-NH), 7.43-7.10 (m, 11H, Ph, CONH₂), 7.06 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.21 (d, 1H, *J* = 12.6, CH₂-Z), 5.05 (d, 1H, *J* = 12.6, CH₂-Z), 4.32 (m, 1H, 1'-H), 3.54 (m, 1H, 4-H), 3.24 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 3.04 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.85 (dd, 1H, *J* = 8.4, 15.9, 4-H), 2.30 (m, 1H, 3-H), 2.10 (m, 2H, 3-H, 2'-H), 1.54 (m, 2H, 2'-H y 3'-H), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.4, 3'-CH₃), 0.85 (d, 3H, *J* = 6.6, 4'-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.2, 174.1 (CONH), 156.4 (1-CO), 136.1, 134.7 (C Ar), 130.4, 129.2, 128.9, 128.8, 128.3, 127.1 (CH Ar), 73.4 (2-C), 67.1 (CH₂-Z), 51.7 (1'-C), 44.9 (4-C), 39.9 (2'-C), 38.9 (2-CH₂), 24.8 (3'-C), 23.6 (3-C), 22.9 (3'-CH₃), 21.9 (4'-C). EM (ES modo positivo): 438.3 [M+1]⁺, 460.2 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₅H₃₁N₃O₄: C, 68.63; H, 7.14; N, 9.60. Exp: C, 68.74; H, 7.24; N, 9.56.

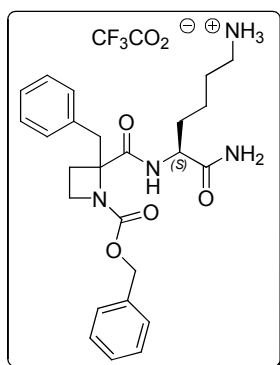
(2*R*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxicarbonil-2-[(1'-carbamoil-3'-metil)butil]carbamoil azetidina ((*R,S*)-1.43d)



Aceite viscoso. Rdto. 27 %. Gradiente de 5 a 25% de acetona en CH₂Cl₂. [α]_D = -6.3 (*c* 0.9, CHCl₃). HPLC: *t*_R = 13.54 min. (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 4.6:1 δ rotámero mayoritario 8.16 (d, 1H, *J* = 7.6, 1'-NH), 7.32-7.10 (m, 10H, Ph), 6.24 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.50 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.23 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 4.99 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 4.39 (m, 1H, 1'-H), 3.45 (d, 1H, *J* =

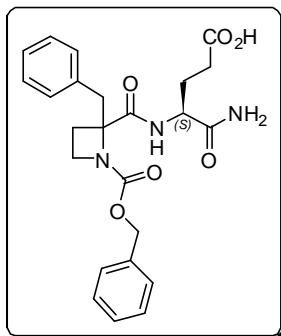
13.8, 2-CH₂), 3.40 (m, 1H, 4-H), 2.87 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.80 (m, 1H, 4-H), 2.52 (m, 1H, 3-H), 2.10 (m, 1H, 3-H), 1.69 (m, 3H, 2'-H y 3'-H), 0.93 (d, 3H, *J* = 5.8, 3'-CH₃), 0.87 (d, 3H, *J* = 5.8, 4'-H). Proporción de rotámeros: 2.2:1 δ rotámero mayoritario 7.94 (d, 1H, *J* = 8.5, 1'-NH), 7.48-7.15 (m, 11H, Ph, CONH₂), 6.99 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.24 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 5.07 (d, 1H, *J* = 12.4, CH₂-Z), 4.35 (m, 1H, 1'-H), 3.48 (m, 1H, 4-H), 3.28 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 3.02 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 2.78 (m, 1H, 4-H), 2.35 (m, 1H, 3-H), 2.14 (m, 2H, 3-H, 2'-H), 1.58 (m, 2H, 2'-H y 3'-H), 0.87 (d, 3H, *J* = 6.6, 3'-CH₃), 0.83 (d, 3H, *J* = 6.7, 4'-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 174.5, 174.2 (CONH), 154.8 (1-CO), 134.6, 130.4 (C Ar), 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 127.2 (CH Ar), 73.5 (2-C), 67.1 (CH₂-Z), 51.6 (1'-C), 44.9 (4-C), 39.9 (2'-C), 39.1 (2-CH₂), 24.8 (3'-C), 23.4 (3-C), 23.1 (3'-CH₃), 21.7 (4'-C). EM (ES modo positivo): 438.3 [M+1]⁺, 460.2 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₅H₃₁N₃O₄: C, 68.63; H, 7.14; N, 9.60. Exp: C, 68.71; H, 7.23; N, 9.52.

Trifluoroacetato de (2*RS*,1'*S*)-2-bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(5'-amino-1'-carbamoil)pentil]carbamoilazetidina ((*RS,S*)-1.43e)



Aceite. Rdto. 93 %. Gradiente de 6 a 25% de metanol en CH₂Cl₂. HPLC: *t_R* = 6.83 min. (A:B = 30:70). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de diastereoisómeros ((*S,S*): (*R,S*) 2.8:1) Diastereoisómero mayoritario Proporción de rotámeros (4.5:1) δ rotámero mayoritario: 8.22 (d, 1H, *J* = 8.1, 1'-NH), 7.95 (s ancho, 2H, 5'-NH₂), 7.43-7.05 (m, 10H, Ph), 6.51 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.39 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.23 (d, 1H, *J* = 12.6, CH₂-Z), 5.01 (d, 1H, *J* = 12.6, CH₂-Z), 4.25 (m, 1H, 1'-H), 3.50 (d, 1H, *J* = 13.7, 2-CH₂), 3.53 (m, 1H, 4-H), 3.01 (d, 1H, *J* = 13.7, 2-CH₂), 2.82 (m, 1H, 4-H), 2.74 (m, 2H, 5'-H), 2.30 (m, 1H, 3-H), 2.07 (m, 1H, 3-H), 1.66 (m, 1H, 2'-H), 1.59 (m, 1H, 2'-H), 1.52 (m, 2H, 4'-H), 1.28 (m, 2H, 3'-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ rotámero mayoritario: 175.3, 174.1 (CONH), 156.4 (1'-CO), 136.4, 135.1 (C Ar), 130.3, 128.5, 128.1, 127.9, 127.3 (CH Ar), 73.2 (2-C), 67.6 (CH₂-Z), 57.4 (1'-C), 44.8 (4-C), 40.5 (5'-C), 39.5 (2-CH₂), 29.8 (4'-C), 29.2 (2'-C), 23.6 (3-C), 23.2 (3'-C). EM (ES modo positivo): 453.3 [M+1]⁺, 475.2 [M+Na]⁺.

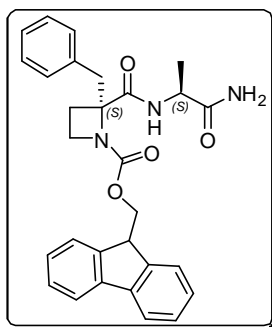
(2*RS*,1'*S*)-2-Bencil-1-benciloxycarbonil-2-[(1'-carbamoyl-3'-carboxi)propil] carbamoylazetidina ((*RS,S*)-1.43f)



Aceite. Rdto. 94 %. Gradiente de 6 a 17% de acetona en CH₂Cl₂. HPLC: t_R = 6.35 min. (A:B = 35:65). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de diastereoisómeros ((*S,S*): (*R,S*) 4.5:1) Diastereoisómero mayoritario Proporción de rotámeros (3.5:1) δ rotámero mayoritario 8.48 (d, 1H, J = 7.8, 1'-NH), 7.43-7.00 (m, 10H, Ph), 6.55 (s ancho, 1H, CONH₂), 6.32 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.29 (d, 1H, J = 12.2, CH₂-Z), 5.05 (d, 1H, J = 12.2, CH₂-Z), 4.59 (m, 1H, 1'-H), 3.55 (m, 1H, 4-H), 3.48 (d, 1H, J = 14.2, 2-CH₂), 2.97 (d, 1H, J = 14.2, 2-CH₂), 2.86 (m, 1H, 4-H), 2.45 (m, 3H, 3-H y 3'-H), 2.19 (m, 2H, 3-H y 2'-H), 2.03 (m, 1H, 2'-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 175.4 (COOH), 174.6, 174.2 (CONH), 157.3 (1-CO), 138.4, 137.7 (C Ar), 132.1, 130.4, 129.9, 129.7, 129.6, 128.3 (CH Ar), 74.3 (2-C), 67.9 (CH₂-Z), 53.8 (1'-C), 46.4 (4-C), 39.4 (2-CH₂), 29.1 (3'-C), 25.3 (2'-C), 23.9 (3-C). EM (ES modo positivo): 454.1 [M+1]⁺, 476.2 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₄H₂₇N₃O₆: C, 63.56; H, 6.00; N, 9.27. Exp: C, 63.34; H, 6.42; N, 9.18.

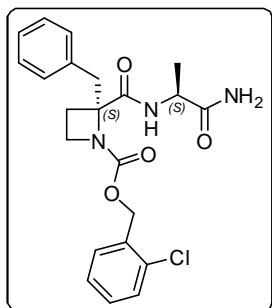
Serie C: Derivados modificados en el nitrógeno azetidínico

(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoil-1-(9-fluorenilmetoxi)carbonil azetidina ((*S,S*)-1.46a)



Aceite viscoso. Rdto: 25%. Gradiente de 4 a 33% de acetona en CH₂Cl₂. [α]_D = +4.0 (c 0.9, CHCl₃). HPLC: *t*_R = 6.67 min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 12:1 δ rotámero mayoritario 8.23 (d, 1H, *J* = 7.3, 1'-NH), 7.79-7.22 (m, 13H, Ar), 6.39 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.35 (s ancho, 1H, CONH₂), 4.51 (m, 2H, 1'-H, 9-CH₂-Fmoc), 4.35 (m, 1H, 9-CH₂ Fmoc), 4.24 (m, 1H, 9-H Fmoc), 3.57 (m, 1H, 4-H), 3.51 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 3.04 (d, 1H, *J* = 13.9, 2-CH₂), 2.96 (m, 1H, 4-H), 2.66 (m, 1H, 3-H), 2.25 (m, 1H, 3-H), 1.44 (d, 3H, *J* = 7.3, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 8.3:1 δ rotámero mayoritario 8.17 (d, 1H, *J* = 7.7, 1'-NH), 7.82-7.25 (m, 14H, Ar, CONH₂), 7.08 (s ancho, 1H, CONH₂), 4.53 (m, 1H, 1'-H), 4.37 (m, 2H, 9-CH₂ Fmoc), 4.16 (m, 1H, 9-H Fmoc), 3.63 (m, 1H, 4-H), 3.26 (d, 1H, *J* = 13.7, 2-CH₂), 3.12 (d, 1H, *J* = 13.7, 2-CH₂), 2.88 (m, 1H, 4-H), 2.42 (m, 1H, 3-H), 2.18 (m, 1H, 3-H), 1.32 (d, 3H, *J* = 6.9, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.1, 173.9 (CONH), 156.4 (1-CO), 143.6, 141.3, 134.7 (C Ar), 127.1, 127.0, 125.1, 125.0, 120.1 (CH Ar), 73.4 (2-C), 67.6 (CH₂-Fmoc), 48.8 (1'-C), 47.1 (CH-Fmoc), 44.9 (4-C), 39.2 (2-CH₂), 23.6 (3-C), 16.9 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 484.5 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₉H₂₉N₃O₄: C, 72.03; H, 6.04; N, 8.69. Exp: C, 72.11; H, 6.09; N, 8.60.

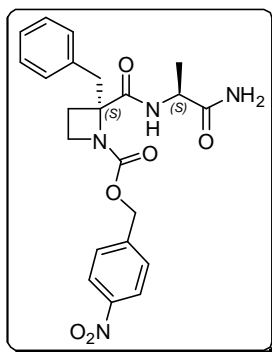
(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoil-1-(2-clorobenciloxi)carbonil azetidina ((*S,S*)-1.46b)



Aceite viscoso. Rdto: 21 %. Gradiente de 9 a 33% de acetona en CH₂Cl₂. [α]_D = +2.9 (c 0.2, CHCl₃). HPLC: *t*_R = 15.84 min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 7.6:1 δ rotámero mayoritario 8.21 (d, 1H, *J* = 7.7, 1'-NH), 7.43-7.14 (m, 9H, Ar), 6.39 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.36 (d, 1H, *J* = 12.7, O-CH₂), 5.27 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.23 (d, 1H, *J* = 12.7, O-CH₂), 4.47 (m, 1H, 1'-H), 3.55 (m, 1H, 4-H), 3.51 (d, 1H, *J* = 14.2, 2-CH₂), 2.93 (m, 1H, 4-H), 3.00 (d, 1H, *J* = 14.2, 2-CH₂), 2.61

(m, 1H, 3-*H*), 2.20 (m, 1H, 3-*H*), 1.43 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 5.6:1 δ rotámero mayoritario 8.19 (d, 1H, $J = 7.8$, 1'-NH), 7.84-7.23 (m, 9H, Ar), 7.21 (s ancho, 1H, CONH₂), 7.12 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.32 (d, 1H, $J = 12.4$, O-CH₂), 5.15 (d, 1H, $J = 12.4$, O-CH₂), 4.24 (m, 1H, 1'-*H*), 3.57 (m, 1H, 4-*H*), 3.38 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 2.93 (m, 2H, 4-*H*, 2-CH₂), 2.62 (m, 2H, 3-*H*), 1.28 (d, 3H, $J = 6.7$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.4, 174.2 (CONH), 155.4 (1-CO), 134.4, 130.2, 129.9 (C Ar) 129.5, 128.3, 127.0, 126.6 (CH Ar), 73.3 (2-C), 64.3 (O-CH₂), 48.6 (1'-C), 44.7 (4-C), 38.9 (2-CH₂), 23.4 (3-C), 16.9 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 430.2 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₂H₂₄ClN₃O₄: C, 61.46; H, 5.63; N, 9.77. Exp: C, 61.51; H, 5.69; N, 9.71.

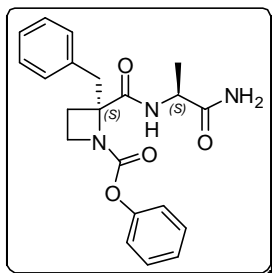
(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoil-1-(4-nitrobenciloxi)carbonil azetidina ((*S,S*)-1.46c)



Sólido. P.f.: 130-132 °C. Rdto: 34 %. Gradiente de 15 a 50% de acetona en CH₂Cl₂. [α]_D = +12.5 (*c* 0.4, CHCl₃). HPLC: *t*_R = 11.47 min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 5.8:1 δ rotámero mayoritario 8.26 (d, 2H, $J = 8.8$, 3*H* y 5*H* NO₂Ph), 8.19 (d, 1H, $J = 7.6$, 1'-NH), 7.53 (d, 2H, $J = 8.8$, 2*H* y 6*H* NO₂Ph), 7.29-7.12 (m, 5H, Ar), 6.29 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.37 (d, 1H, $J = 13.2$, O-CH₂), 5.31 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.18 (d, 1H, $J = 13.2$, O-CH₂), 4.47 (m, 1H, 1'-*H*), 3.57 (m, 1H, 4-*H*), 3.49 (d, 1H, $J = 14.2$, 2-CH₂), 3.01 (d, 1H, $J = 14.2$, 2-CH₂), 2.90 (m, 1H, 4-*H*), 2.67 (m, 1H, 3-*H*), 2.25 (ddd, 1H, $J = 4.9$, 9.3 y 12.2, 3-*H*), 1.42 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 2.8:1 δ rotámero mayoritario 8.26 (d, 2H, $J = 8.4$, 3*H* y 5*H* NO₂Ph), 8.16 (d, 1H, $J = 7.6$, 1'-NH), 7.63 (d, 2H, $J = 8.6$, 2*H* y 6*H* NO₂Ph), 7.35-7.15 (m, 6H, Ar, CONH₂), 7.09 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.36 (d, 1H, $J = 13.6$, O-CH₂), 5.22 (d, 1H, $J = 13.6$, O-CH₂), 4.28 (m, 1H, 1'-*H*), 3.62 (m, 1H, 4-*H*), 3.28 (d, 1H, $J = 13.6$, 2-CH₂), 3.12 (d, 1H, $J = 13.6$, 2-CH₂), 2.86 (m, 1H, 4-*H*), 2.65 (m, 1H, 3-*H*), 2.34 (m, 1H, 3-*H*), 1.26 (d, 3H, $J = 7.5$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 173.9, 173.8 (CONH), 155.8 (1-CO), 147.8, 143.3, 134.5 (C Ar), 130.4, 128.4, 128.3, 127.4, 123.8 (CH Ar), 73.6 (2-C), 65.5 (O-CH₂), 48.7 (1'-C), 44.9 (4-C), 39.2 (2-CH₂), 23.6 (3-C), 17.0 (1'-CH₃). EM

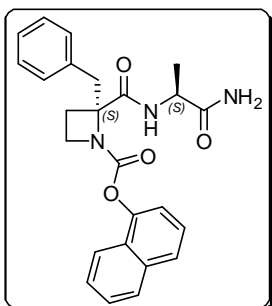
(ES modo positivo): 441.2 $[M+1]^+$. Anal (%) Calc. para $C_{22}H_{24}N_4O_6$: C, 59.99; H, 5.49; N, 12.72. Exp: C, 60.05; H, 5.51; N, 12.69.

((2S,1'S)-2-Bencil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoil-1-feniloxycarbonilazetidina ((S,S)-1.46d)



Espuma. Rdto: 54 %. Gradiente de 15 a 33% de acetona en CH_2Cl_2 . $[\alpha]_D = +23.4$ (c 0.9, $CHCl_3$). HPLC: $t_R = 17.36$ min (A:B = 35:65). 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): Proporción de rotámeros: 4.8:1 δ rotámero mayoritario 8.11 (d, 1H, $J = 7.6$, 1'-NH), 7.44-7.13 (m, 10H, Ar), 6.33 (s ancho, 1H, $CONH_2$), 5.32 (s ancho, 1H, $CONH_2$), 4.49 (m, 1H, 1'-H), 3.70 (m, 1H, 4-H), 3.56 (d, 1H, $J = 14.2$, 2- CH_2), 3.12 (m, 1H, 4-H), 3.07 (d, 1H, $J = 14.2$, 2- CH_2), 2.73 (ddd, 1H, $J = 7.8$, 9.7 y 12.2, 3-H), 2.32 (ddd, 1H, $J = 4.9$, 9.7 y 12.2, 3-H), 1.43 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'- CH_3). 1H RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$): Proporción de rotámeros: 1.5:1 δ rotámero mayoritario 8.19 (d, 1H, $J = 7.6$, 1'-NH), 7.46-7.14 (m, 11H, Ph, $CONH_2$), 7.09 (s ancho, 1H, $CONH_2$), 4.24 (m, 1H, 1'-H), 3.52 (m, 1H, 4-H), 3.28 (d, 1H, $J = 13.8$, 2- CH_2), 3.11 (d, 1H, $J = 13.8$, 2- CH_2), 3.01 (m, 1H, 4-H), 2.42 (m, 1H, 3-H), 2.23 (m, 1H, 3-H), 1.26 (d, 3H, $J = 7.6$, 1'- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ rotámero mayoritario 173.7, 173.6 (CONH), 154.9 (1-CO), 150.4, 134.6 (C Ar), 130.6, 130.4, 129.5, 128.8, 127.5, 125.8, 121.4 (CH Ar), 73.7 (2-C), 48.9 (1'-C), 45.4 (4-C), 39.2 (2- CH_2), 23.7 (3-C), 16.9 (1'- CH_3). EM (ES modo positivo): 382.3 $[M+1]^+$. Anal (%) Calc. para $C_{21}H_{23}N_3O_4$: C, 66.13; H, 6.08; N, 11.02. Exp: C, 66.08; H, 6.16; N, 10.97.

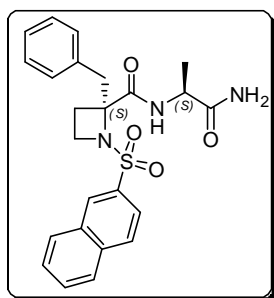
((2S,1'S)-2-Bencil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoil-1-(1-naftiloxi)carbonilazetidina ((S,S)-1.46e)



Aceite viscoso. Rdto: 52 %. Acetona: CH_2Cl_2 (1:6). $[\alpha]_D = +18.1$ (c 0.8, $CHCl_3$). HPLC: $t_R = 13.31$ min (A:B = 40:60). 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): Proporción de rotámeros: 5.4:1 δ rotámero mayoritario 8.18 (d, 1H, $J = 7.8$, 1'-NH), 7.92-7.32 (m, 12H, Ar), 6.30 (s ancho, 1H, $CONH_2$), 5.29 (s ancho, 1H, $CONH_2$), 4.50 (m, 1H, 1'-H), 3.89 (m, 1H, 4-H), 3.59 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 3.32 (m, 1H, 4-H), 3.09 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.81 (ddd, 1H, $J = 7.3$, 9.3 y 11.9, 3-H), 2.40 (ddd, 1H, $J = 4.9$, 9.3 y 11.9, 3-H),

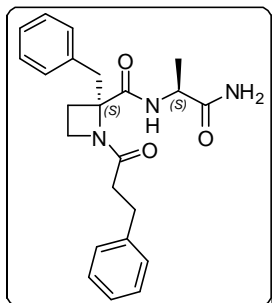
1.42 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): Proporción de rotámeros: 2.2:1 δ rotámero mayoritario 8.16 (d, 1H, $J = 7.7$, 1'-NH), 7.72-7.35 (m, 13H, Ar, CONH₂), 7.31 (s ancho, 1H, CONH₂), 4.32 (m, 1H, 1'-H), 3.64 (m, 1H, 4-H), 3.27 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 3.18 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 2.98 (m, 1H, 4-H), 2.33 (m, 1H, 3-H), 2.28 (m, 1H, 3-H), 1.28 (d, 3H, $J = 7.6$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 173.9, 173.8 (CONH), 154.9 (1-CO), 146.0, 134.7, 134.6, 130.6, 128.7, 128.1, 127.5, 126.9, 126.5, 126.4, 126.1, 125.4, 120.9, 117.9 (C Ar), 73.8 (2-C), 48.9 (1'-C), 45.6 (4-C), 39.3 (2-CH₂), 23.6 (3-C), 16.9 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 432.2 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₅H₂₅N₃O₄: C, 69.59; H, 5.84; N, 9.74. Exp: C, 69.66; H, 5.88; N, 9.68.

(2*S*,1'*S*)-2-Bencil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoil-1-(2-naftil)sulfonilazetidina ((*S,S*)-1.46f)



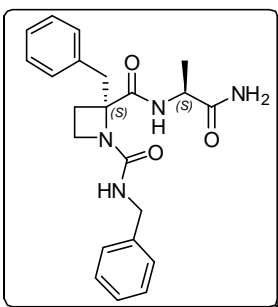
Sólido. P.f.: 154-156 °C. Rdto: 42 %. Acetona: CH₂Cl₂ (1:6). $[\alpha]_D = -41.2$ (c 0.3, CHCl₃). HPLC: $t_R = 17.07$ min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.44 (s ancho, 1H, 1'-NH), 8.08-7.63 (m, 7H, Naft), 7.29-7.15 (m, 5H, Ph), 6.22 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.24 (s ancho, 1H, CONH₂), 4.47 (m, 1H, 1'-H), 3.84 (m, 1H, 4-H), 3.67 (d, 1H, $J = 13.7$, 2-CH₂), 3.39 (m, 1H, 4-H), 3.37 (d, 1H, $J = 13.7$, 2-CH₂), 2.71 (m, 1H, 3-H), 2.31 (m, 1H, 3-H), 1.52 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): 8.51 (s ancho, 1H, 1'-NH), 8.21-7.64 (m, 7H, Naft), 7.41 (s ancho, 1H, CONH₂), 7.28-7.18 (m, 5H, Ph), 7.21 (s ancho, 1H, CONH₂), 4.33 (m, 1H, 1'-H), 3.73 (m, 1H, 4-H), 3.62 (m, 1H, 4-H), 3.48 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 3.24 (d, 1H, $J = 13.8$, 2-CH₂), 2.48 (m, 1H, 3-H), 2.27 (m, 1H, 3-H), 1.36 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 173.6, 171.7 (CONH), 135.2, 135.1, 133.9, 132.1, 130.1, 129.7, 129.4, 128.4, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 122.6, 122.4 (C Ar), 74.8 (2-C), 48.9 (1'-C), 45.8 (4-C), 41.2 (2-CH₂), 24.2 (3-C), 16.7 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 452.2 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para: C₂₄H₂₅N₃O₄S: C, 63.84; H, 5.58; N, 9.31. Exp: C, 63.88; H, 5.61; N, 9.28.

(2S,1'S)-2-Bencil-2-[(1'-carbamoil)etil]carbamoil-1-fenetilcarbonilazetidina ((S,S)-1.46g)



Espuma. Rdto: 28 %. Gradiente de 15 a 33% de acetona en CH_2Cl_2 . $[\alpha]_D = +14.2$ (c 0.2, CHCl_3). HPLC: $t_R = 10.03$ min (A:B = 40:60). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): Proporción de rotámeros: 6.2:1 δ rotámero mayoritario 8.82 (d, 1H, $J = 7.5$, 1'-NH), 7.31-7.15 (m, 10H, Ph), 6.43 (s ancho, 1H, CONH_2), 5.31 (s ancho, 1H, CONH_2), 4.43 (m, 1H, 1'-H), 3.57 (d, 1H, $J = 13.6$, 2- CH_2), 3.46 (m, 1H, 4-H), 2.99 (d, 1H, $J = 13.6$, 2- CH_2), 2.93 (m, 3H, 4-H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.63 (m, 1H, 3-H), 2.29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.17 (m, 1H, 3-H), 1.41 (d, 3H, $J = 7.0$, 1'- CH_3). ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): Proporción de rotámeros: 4.5:1 δ rotámero mayoritario 8.67 (d, 1H, $J = 7.6$, 1'-NH), 7.2 (s ancho, 1H, CONH_2), 7.28-7.16 (m, 10H, Ph), 7.05 (s ancho, 1H, CONH_2), 4.26 (m, 1H, 1'-H), 3.63 (m, 1H, 4-H), 3.33 (d, 1H, $J = 13.6$, 2- CH_2), 2.98 (d, 1H, $J = 13.6$, 2- CH_2), 2.98 (m, 1H, 4-H), 2.82 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.24 (m, 1H, 3-H), 2.07 (m, 1H, 3-H), 1.36 (d, 3H, $J = 7.4$, 1'- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ rotámero mayoritario 174.2, 174.1, 173.8 (CO), 130.4, 128.6, 128.5, 128.4, 127.3, 126.5 (C Ar), 74.8 (2-C), 48.9 (1'-C), 45.8 (4-C), 39.2 (2- CH_2), 33.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 30.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 22.5 (3-C), 16.7 (1'- CH_3). EM (ES modo positivo): 394.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 70.21; H, 6.92; N, 10.68. Exp: C, 70.09; H, 7.07; N, 10.57.

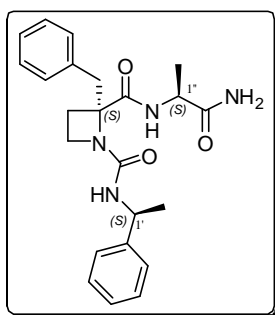
(2S,1'S)-2-Bencil-2-1-bencilcarbamoil-[(1'-carbamoil)etil]carbamoilazetidina ((S,S)-1.46h)



Sólido. P.f.: 123-125 °C Rdto: 44 %. Acetona: CH_2Cl_2 (1:4). $[\alpha]_D = +13.9$ (c 1.0, CHCl_3). HPLC: $t_R = 8.59$ min (A:B = 35:65). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): Proporción de rotámeros: 7.8:1 δ rotámero mayoritario 8.85 (s ancho, 1H, 1'-NH), 7.34-7.21 (m, 11H, Ph y 1-NH), 6.63 (s ancho, 1H, CONH_2), 5.41 (s ancho, 1H, CONH_2), 4.47 (m, 4H, NH- CH_2 , 4-H y 1'-H), 3.58 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 3.38 (m, 1H, 4-H), 2.99 (d, 1H, $J = 13.9$, 2- CH_2), 2.63 (m, 1H, 3-H), 2.22 (m, 1H, 3-H), 1.44 (d, 3H, $J = 7.3$, 1'- CH_3). ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): Proporción de rotámeros: 5.5:1 δ rotámero mayoritario 8.89 (s ancho, 1H, 1'-NH), 7.35-7.18 (m, 12H, Ph, 1-NH, CONH_2), 7.04 (s ancho, 1H,

CONH₂), 4.48-4.18 (m, 4H, NH-CH₂, 4-*H* y 1'-*H*), 3.48 (d, 1H, *J* = 13.8, 2-CH₂), 2.97 (d, 1H, *J* = 13.7, 2-CH₂), 2.83 (m, 1H, 4-*H*), 2.36 (m, 1H, 3-*H*), 2.02 (m, 1H, 3-*H*), 1.21 (d, 3H, *J* = 7.4, 1'-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 174.9, 174.0 (CONH), 158.4 (1-CO), 131.1, 129.2, 128.7, 128.2, 127.8, 127.3 (*C* Ar), 74.1 (2-*C*), 49.3 (1'-*C*), 44.6 (NH-CH₂), 44.3 (4-*C*), 39.5 (2-CH₂), 23.6 (3-*C*), 17.6 (1'-CH₃). EM (ES modo positivo): 395.2 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₂H₂₆N₄O₃: C, 66.99; H, 6.64; N, 14.20. Exp: C, 67.04; H, 6.68; N, 14.15.

(2*S*,1'*S*,1''*S*)-2-Bencil-2-[(1''-carbamoil)etil]carbamoil-1-[(1'-fenil)etil]carbamoil-azetidina ((*S,S*)-1.46i)



Sólido. P.f.: 137-139 °C. Rdto: 35 %. Acetona: CH₂Cl₂ (1:4). [α]_D = +4.0 (*c* 0.9, CHCl₃). HPLC: *t*_R = 6.67 min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros: 7.4:1 δ rotámero mayoritario 8.89 (s ancho, 1H, 1''-NH), 7.46-7.04 (m, 11H, 1'-NH y Ph), 6.60 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.34 (s ancho, 1H, CONH₂), 5.07 (m, 1H, 1'-*H*), 4.48 (m, 1H, 1''-*H*), 3.54 (d, 1H, *J* = 13.7, 2-CH₂), 3.39 (m, 1H, 4-*H*), 2.90 (d, 1H, *J* = 13.7, 2-CH₂), 2.63 (m, 2H, 4-*H* y 3-*H*), 2.17 (m, 1H, 3-*H*), 1.49 (d, 3H, *J* = 7.1, 1'-CH₃), 1.47 (d, 3H, *J* = 7.3, 1''-CH₃). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): Proporción de rotámeros: 4.7:1 δ rotámero mayoritario 8.12 (s ancho, 1H, 1''-NH), 7.38-7.14 (m, 12H, 1'-NH, Ph, CONH₂), 7.06 (s ancho, 1H, CONH₂), 4.97 (m, 1H, 1'-*H*), 4.34 (m, 1H, 1''-*H*), 3.49 (m, 1H, 4-*H*), 3.35 (d, 1H, *J* = 13.6, 2-CH₂), 3.27 (d, 1H, *J* = 13.6, 2-CH₂), 2.82 (m, 2H, 4-*H* y 3-*H*), 2.36 (m, 1H, 3-*H*), 1.36 (d, 3H, *J* = 7.4, 1'-CH₃), 1.24 (d, 3H, *J* = 7.1, 1''-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 175.1, 174.9 (CONH), 156.7 (1-CO), 135.4, 134.5, 129.2, 128.2, 127.9, 127.4 (*C* Ar), 74.1 (2-*C*), 49.8 (1'-*C*), 49.3 (1''-*C*), 44.3 (4-*C*), 39.3 (2-CH₂), 23.4 (3-*C*), 22.8 (1'-CH₃), 17.6 (1''-CH₃). EM (ES modo positivo): 409.2 [M+1]⁺. Anal Calc. para C₂₃H₂₈N₄O₃: C, 67.63; H, 6.91; N, 13.72. Exp: C, 67.69; H, 7.02; N, 13.67

1.6.4. Evaluación de la inhibición de la replicación viral del CMVH

Ensayo de actividad antiviral

El ensayo de inhibición de la replicación viral del CMVH se realizó en multiplaca de 96 pocillos. Se emplearon células de pulmón de embrión humano que fueron infectadas con citomegalovirus humano (cepa Davis) e incubadas durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el virus residual y se incubaron las células durante 7 días a 37°C en un medio con diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar (en duplicado). La inhibición del crecimiento viral se determinó microscópicamente tras la fijación con metanol y tinción con Giemsa. La actividad antiviral se expresa como CE_{50} , concentración requerida para inhibir al 50% el crecimiento viral.

Ensayo de toxicidad

La citotoxicidad de los compuestos fue evaluada mediante el mismo procedimiento experimental que para el ensayo de la actividad antiviral, con la diferencia de que se emplearon células no infectadas, que se incubaron con distintas concentraciones de los compuestos durante 3 días a 37°C. La citotoxicidad se expresa como MCC, concentración citotóxica mínima que causa una alteración microscópicamente detectable de la morfología celular, y CC_{50} , concentración citotóxica mínima requerida para reducir el crecimiento celular en un 50%.

Estos ensayos fueron realizados por el equipo del Dr. Jan Balzarini en el Instituto Rega (Universidad de Lovaina).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Field. A. K. *Antiviral.Chem.Chemother.* **1999**, *10*, 219-232.
- 2) Biron K.K. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 154-163.
- 3) Lischka P., Zimmerman, H. *Curr.Opin.Pharm.* **2008**, *8*, 541-548.
- 4) Kaptein. S., Efferth, T., Leis, M., Rechter, S., Auerochs, S., Kalmer, M., Bruggeman, C., Vink, C., Stammiger, T., Marschall, M. *Antiviral Res.* **2006**, *69*, 60-69.
- 5) Biron, K.K., Harvey, R., Chamberlain, S., Good, S.S., Smith III, A.A., Davis, M.G., Talarico, C.L., Miller, W.H., Ferris, R., Dornsife, R.E., Stanat, S.C., Drach, J.C., Townsed, L.B., Koszalka, G.W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2365-2372.
- 6) Bloom, J.D., DiGrandi, M.J., Dushin, R.G., Curran, K.J., Ross, A.A., Norton, E.B., Terefenko, E., Jones, T.R., Feld, B., Lang, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2929-2932.
- 7) Bloom, J.D., Dushin, R.G., Curran, K.J., Donahue, F., Norton, E.B., Terefenko, E., Jones, T.R., Ross, A.A., Feld, B., Lang, S DiGrandi, M.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3401-3406.
- 8) McGuigan, C., Pathirana, R., Snoeck, R., Andrei, G., De Clercq, E., Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1847-1851.
- 9) De Castro, S., Peromingo, M.T., Naesens, L., Andrei, G., Snoeck, R., Balzarini, J., Velázquez, S., Camarasa, M.-J. *J. Med. Chem.* **2008**, *5*,. 5823-5832.
- 10) Zhou, S., Breitenbach, J.M., Borysko, K.Z., Drach, J.C., Kern, E.R., Gullen, E., Cheng, Y-C., Zemlicka, J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 566-575.
- 11) Kern, E.R., Bidanset, D.J., Hartline, C.B., Yan, Z., Zemlicka, J., Quenelle, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *12*, 4745-4753.
- 12) Zhou, Z., Drach, J.C., Prichard, M.N., Zemlicka, J. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3397-3407.
- 13) Bowlin, T., Brooks, J., Zemlicka, J. *Antiviral Res.* **2009**, *2*, A46-A47.
- 14) Schnute, M.E., Cudahy, M.M, Brideau, R.J., Homa, F.L., Hopkins, T.A., Knechtel, M.L., Oien, N.L., Pitts, T.W., Poorman, R.A., Wathen, M.W., Wieber, J.L. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5794-5804.
- 15) Schnute, M. E., Anderson, D.J., Brideau, R.J., Ciske, F.L., Collier, S.A., Cudahy, M.M., Eggen, M., Genin, M.J., Hopkins, T.A., Judge, T.M., Kim, E.J., Knechtel, M.L., Nair, S.K., Nieman, J.A., Oien, N.L., Scott, A., Tanis, S.P., Vaillancourt, V.A., Wathen, M.W., Wieber, J. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3349-3353.
- 16) Schnute, M. E., Brideau, R.J., Ciske, F.L., Collier, S.A., Cudahy, M.M., Hopkins, T.A., Knechtel, M.L., Oien, N.L., Sackett, R.S., Scott, A., Stephan, M.L., Wathen, M.W., Wieber, J. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3856-3859.

- 17) De Castro, S., García-Aparicio, C., Andrei, G., Snoeck, R., Balzarini, J., Camarasa, M.-J., Velázquez, S. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1582-1591.
- 18) McGuigan, C., Brancale, A., Andrei, G., Snoeck, R., De Clercq, E., Balzarini, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4511-4513.
- 19) Véron, J-B., Enguedard-Gueiffier, C., Snoeck, R., Andrei, G., De Clercq, E., Gueiffier, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7209-7219.
- 20) Véron, J-B., Allouchi, H., Enguedard-Gueiffier, C., Snoeck, R., Andrei, G., De Clercq, E., Gueiffier, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 9536-9545.
- 21) Holwerda, B. C. *Antiviral Res.* **1997**, 35, 1-21.
- 22) Shieh, H.-S.; Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Stegeman, R. A.; Sturman, E. J.; Pak, J. Y.; Wittwer, A. J.; Palmier, M. O.; Wiegand, R. C.; Holwerda, B. C.; Stallings, W. C. *Nature*. **1996**, 383, 279–282.
- 23) Shieh, H.-S.; Stallings, W. C.; Wittwer, A. J.; Hippenmeyer, P.; Kurumbail, R. G.; Holwerda, B. C. *Int. Antiviral News*, **1997**, 5, 71–73.
- 24) Chen, P.; Tsuge, H.; Almassy, R.J.; Gribskov, C.L.; Katoh, S.; Vanderpool, D.L.; Margosiak, S.A.; Pinko, C.; Matthews, D.A., Kan, C-C. *Cell*, **1996**, 86, 835-843.
- 25) Liang, P.-H.; Brun, K. A.; Field, J. A.; O'Donnell, K.; Doyle, M. L.; Green, S. M.; Baker, A. E.; Blackburn, M. N.; Abdel-Meguid, S. S. *Biochemistry*, **1998**, 37, 5923–5929.
- 26) Bonneau, P.R.; Grand-Matre, C.; Greenwood, D.J.; Lagac, L.; LaPlante, S.R.; Massariol, M-J.; Ogilvie, W.W.; O'Meara, J.A.; Kawai, S.H. *Biochemistry*, **1997**, 36, 12644-12652.
- 27) Ogilvie, W.; Bailey, M.; Poupart, M.-A.; Abraham, A.; Bhavsar, A.; Bonneau, P.; Bordeleau, J.; Bousquet, Y.; Chabot, C.; Duceppe, J.-S.; Fazal, G.; Goulet, S.; Grand-Maitre, C.; Guse, I.; Halmos, T.; Lavallée, P.; Leach, M.; Malenfant, E.; O'Meara, J.; Plante, R.; Plouffe, C.; Poirier, M.; Soucy, F.; Yoakim, C.; Déziel, R. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 4113–4135.
- 28) LaPlante, S. R.; Bonneau, P.; Aubry, N.; Cameron, D. R.; Déziel, R.; Grand-Maitre, C.; Plouffe, C.; Tong, L.; Kawai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2974–2978.
- 29) Pinto, I. L.; Jarvest, R. L.; Clarke, B.; Dabrowski, C. E.; Fenwick, A.; Gorczyca, M. M.; Jennings, L. J.; Lavery, P.; Sternberg, E. J.; Tew, D. G.; West, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 449–452.
- 30) Smith, D. G.; Gribble, A. D.; Haigh, D.; Ife, R. J.; Lavery, P.; Skett, P.; Slingsby, B. P.; Stacey, R.; Ward, R. W.; West, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 3137–3142.
- 31) Ertl, P.; Cooper, D.; Allen, G.; Slater, M.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2863-2866.
- 32) Borthwick, A. D.; Angier, S. J.; Crame, A. J.; Exall, A. M.; Haley, T. M.; Hart, G. J.; Mason, A. M.; Pennell, A. M. K.; Weingarten, G. G. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4452–4464.

- 33) Borthwick, A. D.; Crame, A. J.; Ertl, P. F.; Exall, A. M.; Haley, T. M.; Hart, G. J.; Mason, A. M.; Pennell, A. M. K.; Sing, O. M. P.; Weingarten, G. G.; Woolven, J. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1–18.
- 34) Borthwick, A. D.; Exall, A. M.; Haley, T. M.; Jackson, D. L.; Mason, A. M.; Weingarten, G. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1719–1722.
- 35) Borthwick, A. D.; Davies, D. E.; Ertl, P. F.; Exall, A. M.; Haley, T. M.; Hart, G. J.; Jackson, D. L.; Parry, N. R.; Patikis, A.; Trivedi, N.; Weingarten, G. G.; Woolven, J. M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4428–4449.
- 36) Borthwick, A. D.; *Med. Chem. Rev.* **2005**, *25*, 427–425.
- 37) Dhanak, D.; Keenan, R.M.; Burton, G.; Kaura, A.; Darcy, M.G.; Shah, D.H.; Ridgers, L.H.; Breen, A.; Lavery, P.; Tew, D.G.; West, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3677–3682.
- 38) Gopalsamy, A.; Lim, K.; Ellingboe, J. W.; Mitsner, B.; Nikitenko, A.; Upeslakis, J.; Mansour, T. S.; Olson, M. W.; Bebernitz, G. A.; Grinberg, D.; Feld, B.; Moy, F. J.; O'Connell, J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1893–1899.
- 39) Han, W.T.; Trehan, A.K.; Wright, K.K.; Federici, M.E.; Seller, S.M.; Meanwell, N.A. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1123–1143.
- 40) Shah, S.K.; Dorn, J.C.; Finke, P.E.; Hale, J.J.; Hagmann, W.K.; Brause, K.A.; Chandler, G.; Kissinger, A.L.; Ashe, B.M.; Weston, W.B.; Knight, W.B.; Maycock, I.A.; Dellea, P.; Fletcher, D.S.; Hand, K.M.; Munford, R.A.; Underwood, D.J.; Doherty, J.B. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3745–3754.
- 41) Finke, P. E.; Shah, S. K.; Fletcher, D. S.; Ashe, B. M.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Dellea, P. S.; Hand, K. M.; Maycock, A. L.; Osinga, D. G.; Underwood, D. J.; Weston, H.; Davies, P.; Doherty, J. B. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2449–2462.
- 42) Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Becker, G. W.; Chen, B.; Cheng, L.; Cooper, S. L.; Hermann, R. B.; Howe, T. J.; McCoull, W.; McNulty, A. M.; Neubauer, B. L.; Pritchard, G. J. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1491–1508.
- 43) Borthwick, A. D.; Weingarten, G.; Haley, T. M.; Tomaszewski, M.; Wang, W.; Hu, Z.; Bedard, J.; Jin, H.; Yuen, L.; Mansour, T. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 365–370.
- 44) Déziel, R.; Malenfant, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1437–1442.
- 45) Yoakim, C.; Ogilvie, W.; Cameron, D. R.; Chabot, C.; Guse, I.; Haché, B.; Naud, J.; O'Meara, J. A.; Plante, R.; Déziel, R. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2882–2891.
- 46) Yoakim, C.; Ogilvie, W. W.; Cameron, D. R.; Chabot, C.; Grand-Maitre, C.; Guse, I.; Haché, B.; Kawai, S.; Naud, J.; O'Meara, J. A.; Plante, R.; Déziel, R. *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 379–387.

- 47) Ogilvie, W.; Yoakim, C.; Do, F.; Haché, B.; Lagacé, L.; Naud, J.; O'Meara, J. A.; Déziel, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1521–1531.
- 48) Bonneau, P.; Hasani, F.; Plouffe, C.; Malenfant, E.; Laplante, S. R.; Guse, I.; Ogilvie, W. W.; Plante, R.; Davidson, W. C.; Hopkins, J. L.; Morelock, M. M.; Cordingley, M. G.; Déziel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2965–2973.
- 49) Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M.J.; García-López, M.T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; González-Muñiz, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2253–2256.
- 50) Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M.J.; García-López, M.T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; González-Muñiz, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2612–2621.
- 51) Sanderson, P. E. J. *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 179–197.
- 52) Leung, D.; Abbenante, G.; Failie, D. P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305–441.
- 53) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Herranz, R.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3538–3547.
- 54) Gerona-Navarro, G.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3953–3956.
- 55) Bonache, M. A.; Gerona-Navarro, G.; García-Aparicio, C.; Alías, M.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2161–2169.
- 56) Bonache, M. A.; Gerona-Navarro, G.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Synlett* **2003**, *7*, 1007–1011.
- 57) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Alías, M.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2193–2196.
- 58) Gerona-Navarro, G.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6145–6148.
- 59) Baeza, J. L.; Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3689–3693.
- 60) Baeza, J. L.; Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1740–1715.
- 61) Baeza, J. L.; Gerona-Navarro, G.; Thompson, K.; Pérez de Vega, M. J.; Infantes, L.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8203–8211.
- 62) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512–523.
- 63) Belvisi, L.; Gennari, C.; Mielgo, A.; Potenza, D.; Scolastico, C. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 389–400.
- 64) Wang, J-Q.; Weyand, E. H.; Harvey, R. G. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6216–6219.
- 65) Shemer, H.; Linden, K. G.; *Water Research* **2007**, *41*, 853–861.

- 66) Tyndall, J.D.A.; Nall, T.; Fairlie, D.P. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 973-999.
- 67) Zaitsev, A. B.; Adolfsson, H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5129-5132.
- 68) Kim, J-M.; Wilson, T.E.; Norman, T.C.; Schultz, P.G. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5309-5312.
- 69) Maekawa, K.; Kubo, K.; Igarashi, T.; Sakurai, K. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *61*, 11211-11224.
- 70) Cortes, S.; Liao, Z-K.; Watson, D.; Kohn, H. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 601-606.
- 71) Zvilichovsky, G.; Yahia, I.G-H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4966-4973.
- 72) Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook., P.I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- 73) Christensen., T. *Acta Chem.Scand.B.* 1979, *33*, 763-766.

CAPÍTULO 2

β -LACTAMAS 1,3,4,4-TETRASUSTITUIDAS: SÍNTESIS Y APLICACIONES



2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Importancia biológica de las β -lactamas

El descubrimiento de la estructura química de la penicilina en el año 1949 y la identificación del anillo de 2-azetidinona como una subunidad estructural clave en la actividad biológica de dicho compuesto, supuso un gran desarrollo en los métodos de síntesis de este esqueleto heterocíclico¹.

Muchos de los derivados de 2-azetidinonas naturales o sintéticos ocupan un lugar privilegiado por sus propiedades antibióticas, ya que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana²⁻⁴. El fundamento químico de la actividad biológica y de la inhibición enzimática de los antibióticos β -lactámicos parece estar directamente relacionado con la reactividad del anillo de cuatro miembros y, en particular, con la susceptibilidad del grupo carbonilo a los ataques nucleófilos. De las diferentes familias de antibióticos β -lactámicos destacan las penicilinas (**2.1**), cefalosporinas (**2.2**) y carbapenems (**2.3**), entre los sistemas bicíclicos, y las nocardicinas y monobactamas (**2.4**), entre los monocíclicos. (Figura 2.1).

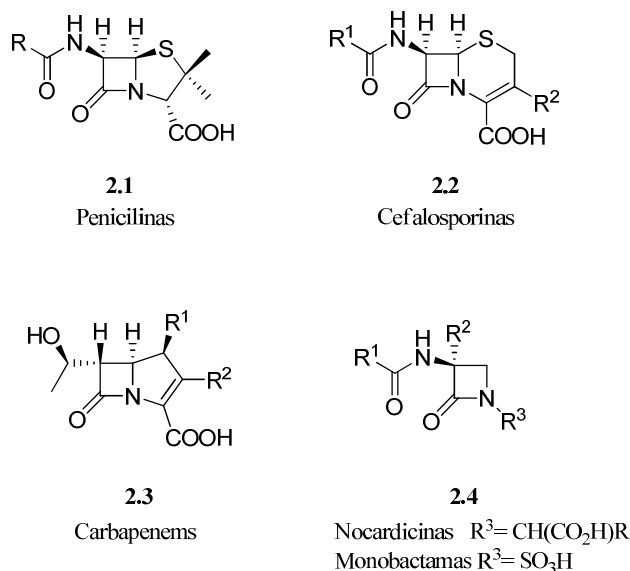


Figura 2.1. Estructura química básica de las principales familias de antibióticos β -lactámicos

Las β -lactamas indicadas en la Figura 2.1 constituyen la familia de antibióticos más empleada, suponiendo más del 50% del mercado mundial. Las diferentes familias de antibióticos β -lactámicos difieren en su espectro de acción y en su susceptibilidad a las enzimas β -lactamasas, el motivo más común de resistencia antibacteriana de estas familias. En los últimos años, algunos antibióticos β -lactámicos están siendo también estudiados como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica^{5,6}.

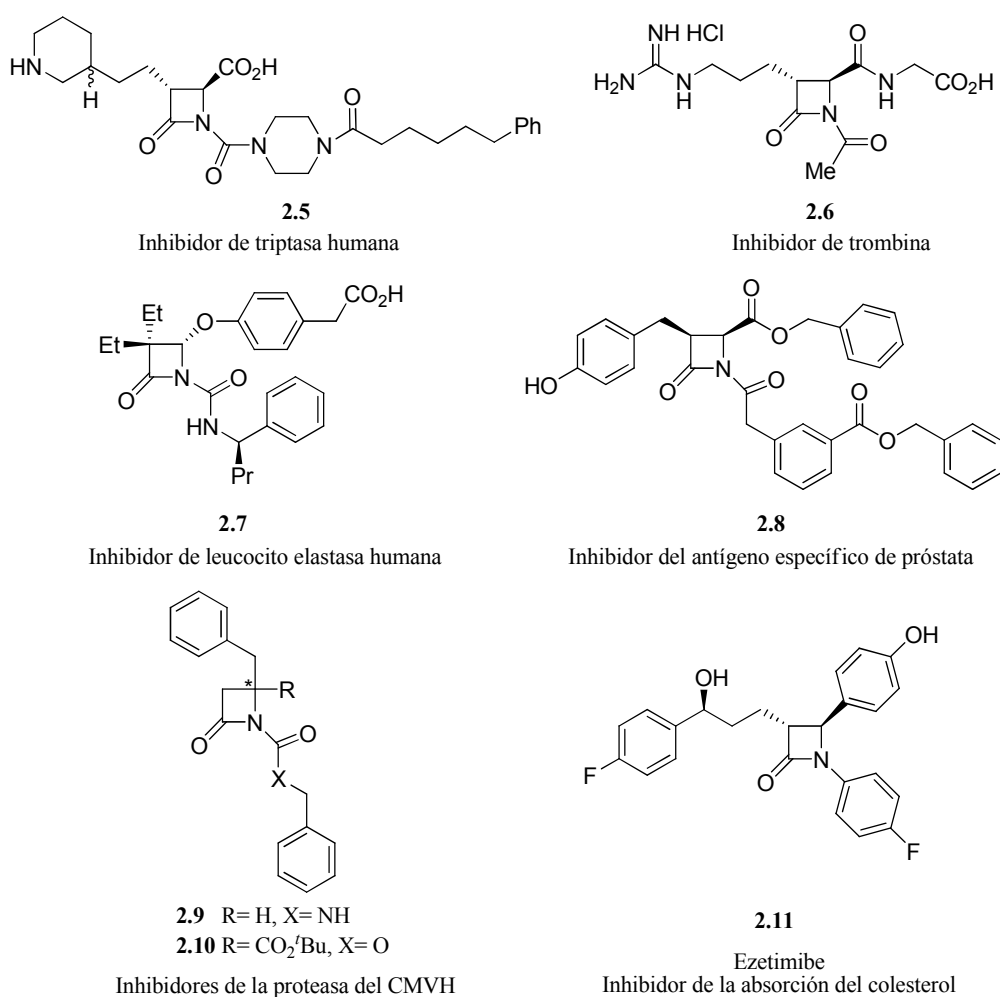


Figura 2.2 Inhibidores enzimáticos de naturaleza β -lactámica

Más recientemente, se han encontrado nuevas y prometedoras aplicaciones de las β -lactamas monocíclicas como inhibidores enzimáticos de serina proteasas. Algunos ejemplos representativos de inhibidores de triptasa (**2.5**)^{7,8}, trombina (**2.6**)⁹, leucocito elastasa humana (**2.7**)¹⁰⁻¹⁴, antígeno específico de próstata (**2.8**)¹⁵ y citomegalovirus humano (**2.9** y **2.10**)^{16,17} se recogen en la Figura 2.2. Como característica estructural común, todos estos inhibidores de proteasas presentan el nitrógeno de la lactama acilado, activando el anillo β -lactámico para facilitar el ataque nucleófilo del OH del residuo de Ser presente en el sitio activo de estas enzimas.

Por otra parte, el derivado β -lactámico 1,3,4-trisustituido Ezetimibe (**2.11**) ha sido comercializado recientemente como inhibidor de la absorción del colesterol¹⁸⁻²¹. Aunque el mecanismo de acción del Ezetimibe a nivel molecular no se conoce con precisión, parece que este principio activo se une a la proteína NPC1L1, un mediador de la absorción del colesterol presente en las células gastrointestinales, epiteliales y en hepatocitos. Además de este efecto directo, la disminución de la absorción del colesterol produce una sobrerregulación de los receptores de LDL (lipoproteínas de baja densidad), incrementando la recaptación del colesterol hacia el interior de las células y, por tanto, disminuyendo la concentración de colesterol en el plasma sanguíneo.

El esqueleto monocíclico de β -lactama se ha empleado también como base para el diseño de nuevos agentes anticancerosos (Figura 2.3). En los últimos años, se ha desarrollado una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer basada en la activación selectiva de la apoptosis o muerte celular programada de células tumorales. Así pues, se ha potenciado la búsqueda de compuestos que sean capaces bien de inducir la apoptosis directamente o bien de interaccionar con las enzimas implicadas en este proceso. En el año 2002, Dou *et al.* publicaron la primera familia de derivados β -lactámicos con propiedades antitumorales²²⁻²⁴. Estas azetidionas, entre las que destaca el compuesto **2.12**, son capaces de inducir apoptosis mediante la activación de caspasas en diferentes líneas tumorales, como cáncer de mama o próstata, entre otras. Más recientemente, se ha publicado la actividad antitumoral del derivado β -lactámico **2.13**, que actúa como un potente inhibidor covalente de la enzima 20S proteasoma, también implicada en la activación de la apoptosis²⁵. Este derivado presentó actividad antitumoral en el rango nanomolar frente a una línea de cáncer de mama (MDA-MB-435, CI_{50} = 32nm).

Los antibióticos endiinos de origen natural se encuentran entre los agentes antitumorales más potentes^{26,27}. En la actualidad, la investigación en este campo se centra en la búsqueda de derivados con una menor complejidad estructural que la de los respectivos productos naturales. En este sentido, cabe destacar el derivado de azetidinona **2.14** con potencia citotóxica en el rango nanomolar en varias líneas tumorales²⁸.

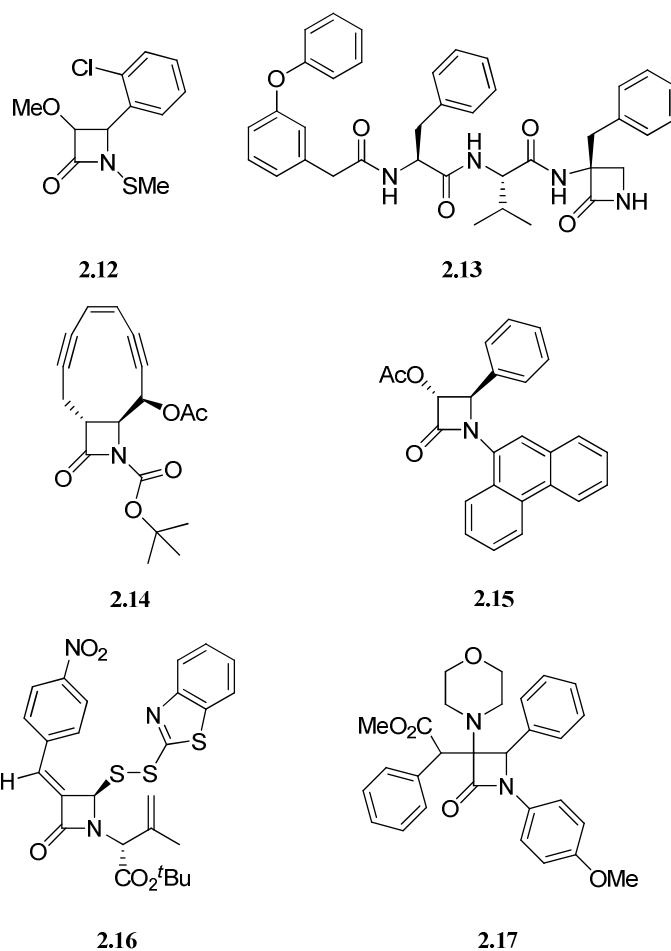


Figura 2.3. Derivados β -lactámicos con propiedades antitumorales

También es destacable la actividad antitumoral de una familia de β -lactamas, entre las que destaca el compuesto **2.15**, en la que se observó una dependencia clara de la

potencia citotóxica con la presencia de al menos tres anillos aromáticos en el nitrógeno de la azetidinona^{29,30}. Por último, señalar también la actividad antitumoral de una serie sulfonilpenilicinas y sus derivadas 4-ditio-2-azetidinonas (**2.16**)³¹⁻³³, así como la de la 3,4-diaril β -lactama (**2.17**)³⁴.

2.1.2. Las β -lactamas como intermedios en la generación de diversidad estructural

La especial reactividad de las 2-azetidinonas ha propiciado su utilización como precursores sintéticos para la generación de diversidad molecular. Así, se han empleado β -lactamas enantioméricamente puras como sintones quirales en la preparación de α - y β -aminoácidos, heterociclos y derivados dipeptídicos³⁵⁻³⁸ (Figura 2.4).

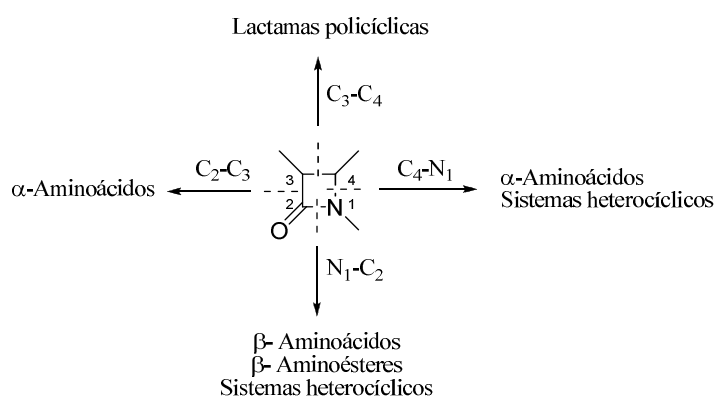
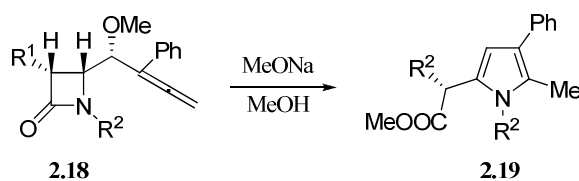


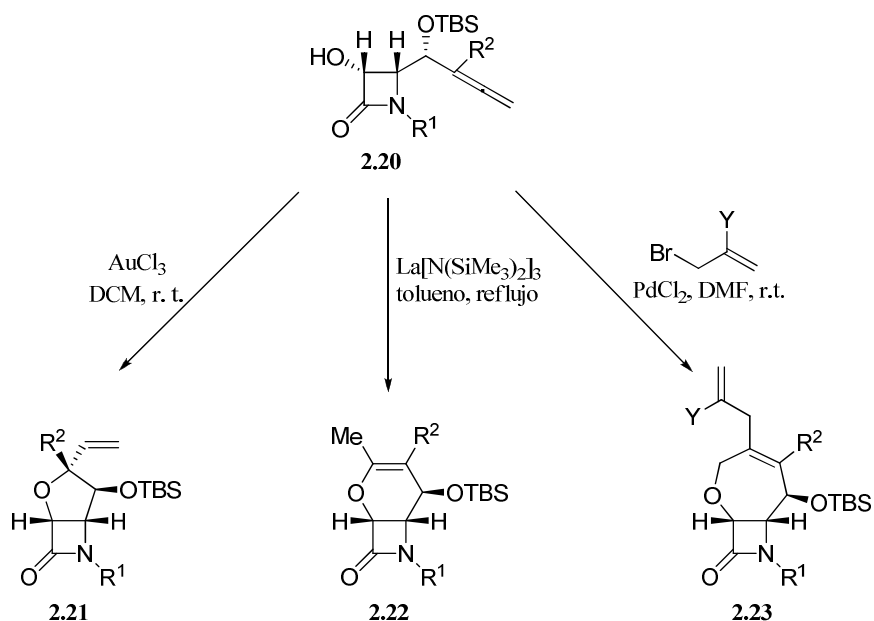
Figura 2.4. β -lactamas como intermedio de síntesis

Dentro de este campo cabe destacar el trabajo desarrollado por Alcaide *et al.* en la preparación de diversos sistemas heterocíclicos a partir de derivados β -lactámicos³⁹⁻⁴². En el Esquema 2.1 se recoge, a modo de ejemplo representativo, la síntesis de pirroles polisustituidos a partir de (α -alcoxialenil)- β -lactamas, por tratamiento con metóxido sódico en metanol, mediante un proceso dominó que implica la apertura del anillo de 2-azetidinona seguido de aminociclación con el grupo alénico y aromatización del anillo formado⁴².



Esquema 2.1

Por otra parte, es digno de mención también el extenso trabajo de este grupo de investigación en la síntesis de sistemas policíclicos fusionados al anillo de 2-azetidinona⁴³⁻⁴⁶. Resaltar especialmente las reacciones de heterociclación de γ -alenoles catalizada por metales, en un proceso regiocontrolado que da lugar a una amplia variedad de tetrahidrofuranos, tetrahidropiranos y tetrahidrohidrooxepinas fusionadas al anillo β -lactámico⁴⁵⁻⁴⁶. En este proceso, la regioselectividad puede ser controlada, entre otros factores, por el catalizador metálico utilizado (Esquema 2.2).



Esquema 2.2

2.1.3. Peptidomiméticos β -lactámicos

El esqueleto β -lactámico también se ha empleado como unidad estructural capaz de inducir estructuras secundarias peptídicas bien definidas. Dentro de este campo cabe destacar la aproximación designada por el acrónimo β -LSAD (*β -Lactam Scaffold-Assisted Design*), desarrollada por Palomo *et al*⁴⁷⁻⁵⁰. Como se muestra en la figura 2.5, esta aproximación está basada en la introducción en la secuencia peptídica de un anillo de 2-azetidiona que, con respecto al péptido original, incorpora un elemento de restricción mínimo (un grupo metileno), que no debería dificultar su aproximación al receptor. En la estrategia β -LSAD se separan los elementos de reconocimiento, cadenas laterales R^1 y R^2 , del elemento de restricción.

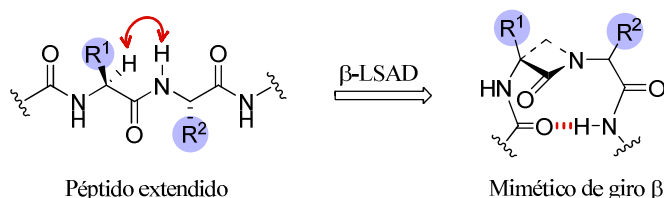


Figura 2.5. Representación del modelo β -LSAD

La eficacia de esta estrategia fue comprobada en el diseño del peptidomimético de melanostatina **2.24**⁴⁸ (Figura 2.6), para el que se ha demostrado mediante RMN que adopta conformación de giro β en disolución. Además, el compuesto **2.24** posee efecto modulador de la fijación de agonistas a los receptores dopaminérgicos D_2 ⁴⁸.

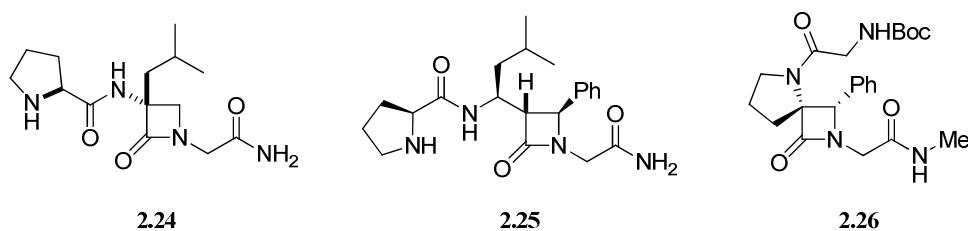


Figura 2.6. Peptidomiméticos β -lactámicos

En la figura 2.6 se recogen otros ejemplos representativos de peptidomiméticos β -lactámicos desarrollados por distintos grupos de investigación^{51,52}. Así, Podlech *et al*

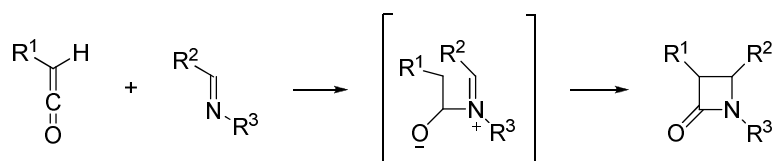
describieron la síntesis y la estructura de Rayos X del análogo restringido de melanostatina **2.25**⁵¹. Aunque la estructura cristalina de este compuesto indica la existencia de un giro β , conformación bioactiva sugerida para el péptido nativo, no se indican datos de actividad para este derivado β -lactámico. Por otra parte, el esqueleto de espiro β -lactama presente en el derivado **2.26** fuerza a este péptido a adoptar conformaciones de giro β en disolución, en total acuerdo con los cálculos teóricos utilizados para su diseño⁵².

2.1.4. Métodos de síntesis de β -lactamas

2.1.4.1. Métodos de síntesis en disolución

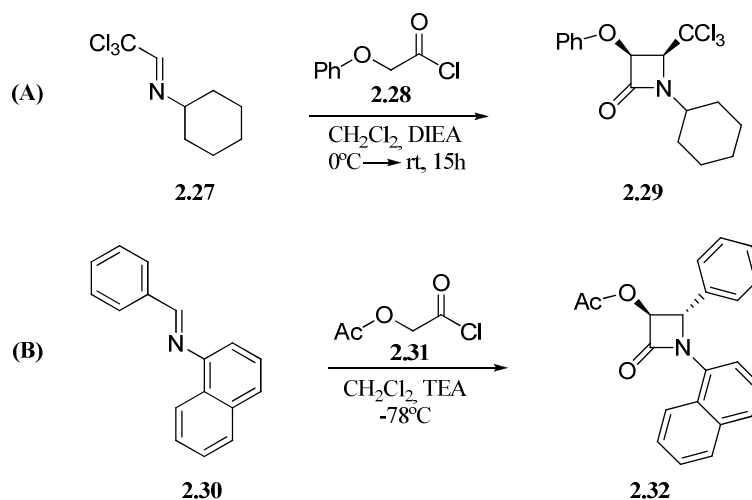
Existen numerosos métodos para la síntesis en disolución de 2-azetidinonas^{53,54}. Estos procedimientos se pueden agrupar en dos grandes categorías: (a) aquellos procesos que dan lugar al anillo heterocíclico por formación simultánea de más de un enlace y (b) los que suponen la formación de un solo enlace para la generación del esqueleto β -lactámico (ciclaciones intramoleculares).

Dentro del primer apartado, la reacción más utilizada, por su sencillez y eficacia, es el procedimiento de Staudinger⁵⁵, que implica la cicloadición [2+2] entre iminas y cetenas. El mecanismo de esta reacción se puede explicar a través del ataque nucleófilo del nitrógeno íminico al carbono con hibridación sp de la cetena, formando un intermedio zwitteriónico que evoluciona para dar lugar al anillo de azetidinona (Esquema 2.3).



Esquema 2.3

La estereoquímica de las 2-azetidinonas obtenidas por el método de Staudinger puede ser *cis* o *trans* o mezcla de ambos isómeros. Es conocido que, tanto la naturaleza de los sustituyentes en las iminas como en los cloruros de ácido empleados como precursores de las cetenas, el tipo de base y el de disolvente, así como las condiciones de reacción y el orden de adición de los reactivos afectan a la selectividad con que se forma el anillo de azetidinona. En la actualidad se está investigando esta reacción tanto desde el punto de vista sintético como mecanístico para poder obtener 2-azetidinonas de forma estereocontrolada^{56,57}. En el Esquema 2.4 se muestran, a modo de ejemplo, dos procedimientos sintéticos que conducen a la formación exclusiva de β -lactamas *cis* (**A**)⁵⁸ y *trans* (**B**)^{59,60}.



Esquema 2.4

Diferentes modificaciones del protocolo de síntesis de Staudinger han permitido también la preparación de 2-azetidinonas enantiómericamente puras, incorporando auxiliares quirales en la cetena o en la imina. Así, en los ácidos carboxílicos o cloruros de ácido, empleados como precursores de la correspondientes cetenas, se han utilizado como elementos inductores de asimetría derivados de oxazolidonas⁶¹ (**2.33**), (-)-efredina⁶² (**2.34**), (+)-3-careno⁶³ (**2.35**), canforsultamas⁶⁴ (**2.36**) y D-(+)-glucosa⁶⁵ (**2.37**) (Figura 2.7).

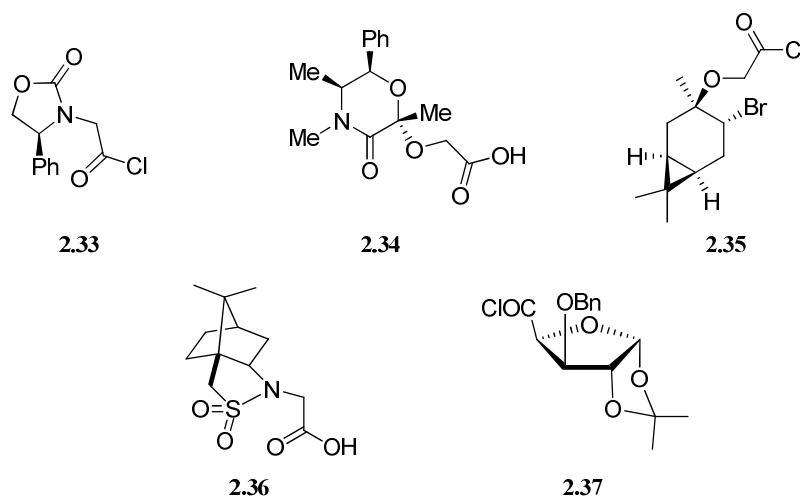


Figura 2.7. Principales auxiliares quirales empleados en la síntesis enantioselectiva de β -lactamas

Por su parte, las iminas quirales se han preparado a partir de aldehídos o aminas ópticamente puros. En la Figura 2.8 se recogen algunos ejemplos representativos, como son los aldehídos derivados de *C*-glicósidos⁶⁶ (**2.38**), el acetónido del (*R*)-gliceraldehído⁶⁷⁻⁶⁹ (**2.39**), complejos de Cr⁷⁰ (**2.40**) o diferentes hidrazinas quirales^{71, 72} (**2.41** y **2.42**).

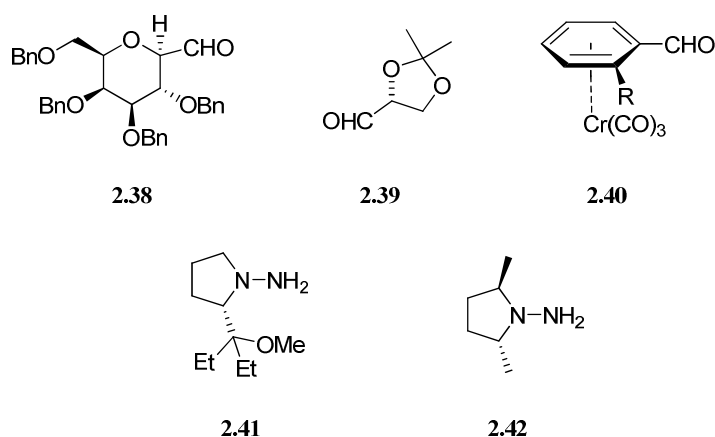
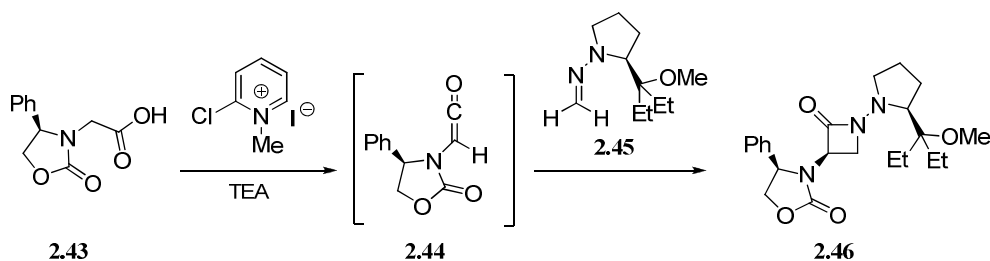


Figura 2.8. Ejemplos representativos de aldehídos e hidrazinas quirales utilizados como precursores de iminas para la síntesis enantioselectiva de β -lactamas

También se han desarrollado reacciones de doble estereodiferenciación, en las que tanto la imina como la cetena son quirales^{73,74}. En el Esquema 2.5, se recoge un ejemplo de estas reacciones de doble inducción asimétrica, en la que la cicloadición de la cetena **2.44** y la hidrazona **2.45** quirales transcurre con un 94% de rendimiento y alta diastereoselectividad (99:1) en la formación de la β -lactama **2.46**⁷³.



Esquema 2.5

También se está explorando la reacción de Staudinger en presencia de catalizadores quirales (Figura 2.9). Así, se ha descrito el empleo de derivados de cincona⁷⁵ (**2.47**) o ferroceno⁷⁶ (**2.48**) para la síntesis asimétrica de 2-azetidionas. Recientemente se ha empleado el derivado **2.49** como catalizador de la reacción de Staudinger a través de un mecanismo mediado por carbenos⁷⁷.

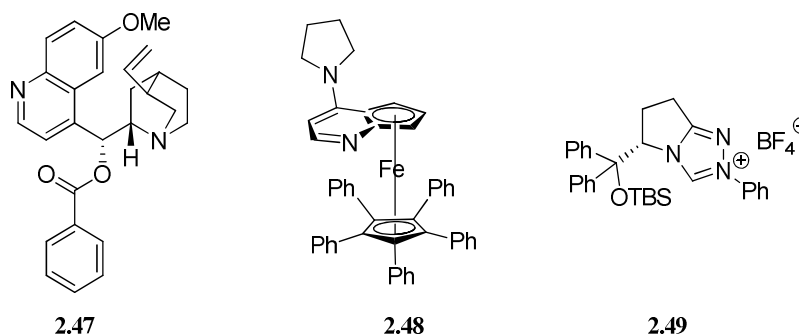
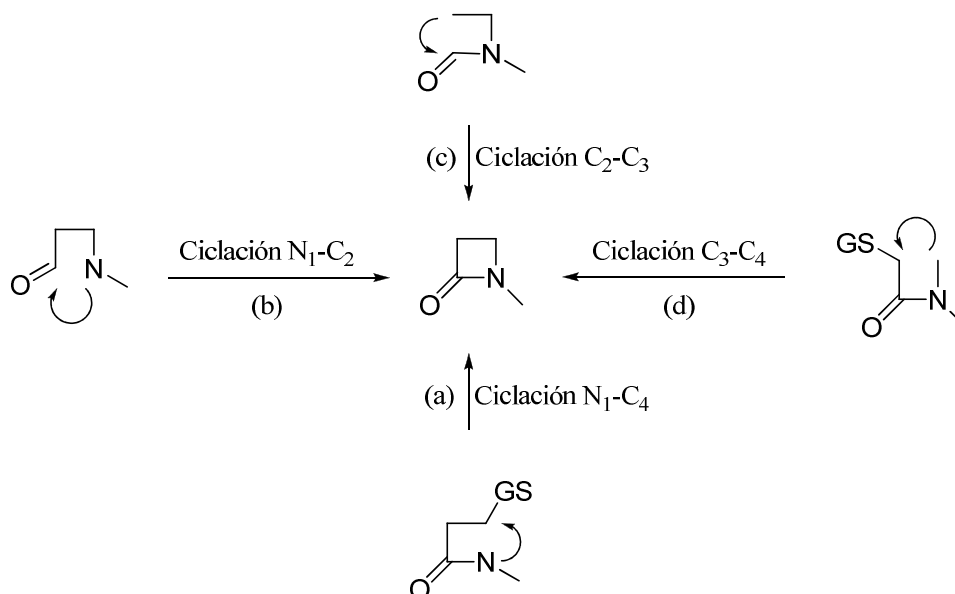


Figura 2.9. Catalizadores quirales utilizados en la reacción de Staudinger

Dentro de los métodos de obtención de β -lactamas que implican la formación de más de un enlace destaca también la reacción de Gilman-Speeter, basada en la condensación de enolatos con iminas⁷⁸. Dentro de este grupo, se incluyen las modificaciones a la reacción de Reformatsky, que permite la formación de β -lactamas a partir de iminas y α -bromoésteres, inducida por Zn^{79,80}. Otros métodos relacionados son la condensación de enolatos de litio⁸¹ y enolatos de tioéster con iminas. Esta segunda reacción ha sido ampliamente estudiada con diferentes metales que estabilizan el enolato y empleando como sustratos iminas y enolatos quirales, o ambos al mismo tiempo, constituyendo así nuevos ejemplos de reacciones de doble inducción asimétrica⁸².

Otras aproximaciones para la obtención de β -lactamas mediante la formación simultánea de más de un enlace incluyen la cicloadición de acetiluros de cobre a nitronas (reacción de Kinugasa)⁸³, la cicloadición de isocianatos a alquenos⁸⁴ y las que implican reacciones de ciclocarbonilación⁸⁵.

Las metodologías de preparación de β -lactamas que transcurren a través de un proceso de ciclación, con formación de un solo enlace, se clasifican en función de los átomos implicados en la formación del nuevo enlace (Esquema 2.6). Así, nos encontramos con reacciones en las que la formación del anillo transcurre a través del enlace: nitrógeno-carbono N_1-C_4 (a), amida N_1-C_2 (b), carbono-carbono C_2-C_3 (c) y carbono-carbono C_3-C_4 (d).

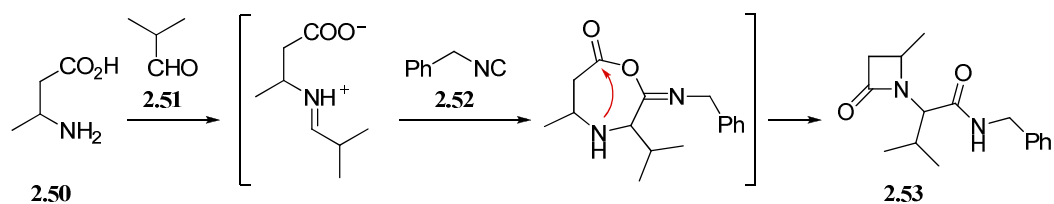


Esquema 2.6

La ciclación N_1-C_4 se basa, en general, en el desplazamiento nucleófilo de un grupo saliente situado en posición C_4 por el nitrógeno N_1 , apropiadamente activado. Dentro de este campo, la aproximación más utilizada ha sido la ciclación de β -hidroxiamidas mediante la reacción de Mitsunobu⁸⁶.

El método más empleado para la síntesis del anillo de 2-azetidinona *vía* ciclación N_1-C_2 consiste en la ciclación de β -aminoácidos sustituidos. Para la activación del ácido carboxílico se han empleado agentes de acoplamiento convencionales, como carbodiimidas⁸⁷ así como el reactivo de Mukaiyama⁸⁸, o la combinación de di(2-piridinil) disulfuro/trifenilfosfina⁸⁹. Otra alternativa consiste en la ciclación de β -aminoésteres en presencia de bases fuertes como LHMDs⁵⁰. Asimismo, dentro de este grupo se puede

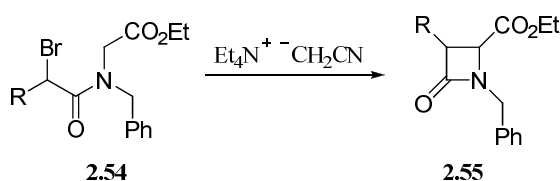
incluir también la condensación de Ugi de 4 componentes, que consiste en la reacción de β -aminoácidos con aldehídos e isonitrilos, y que ha permitido la preparación de diferentes 2-azetidionas mono- y bicíclicas, mediante el proceso representado en el Esquema 2.7⁹⁰.



Esquema 2.7

La preparación de 2-azetidionas mediante formación del enlace C_2-C_3 es un proceso complejo y son muy escasos los procedimientos de síntesis que posibilitan la obtención de β -lactamas por medio de esta ciclación, destacando entre los más conocidos aquellos basados en las ciclaciones de radicales carbamoilo^{91,92}.

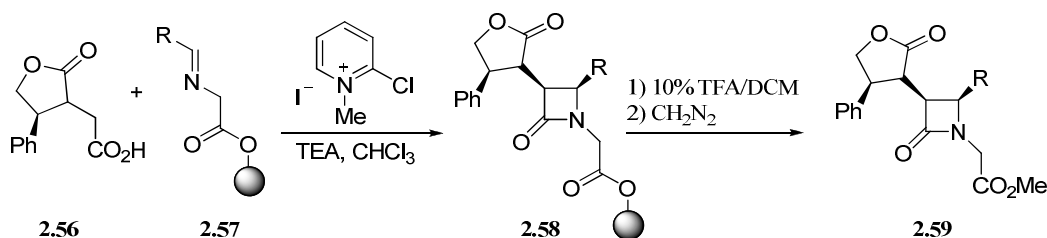
En cuanto a la preparación de 2-azetidionas mediante ciclación intramolecular C_3-C_4 , el protocolo más utilizado para la generación del anillo β -lactámico es la reacción de sustitución nucleófila⁹³⁻⁹⁵ (Esquema 2.8). Alternativamente, también se han empleado metodologías organometálicas de inserción de carbenos⁹⁶



Esquema 2.8

2.1.4.2. Métodos de síntesis en fase sólida

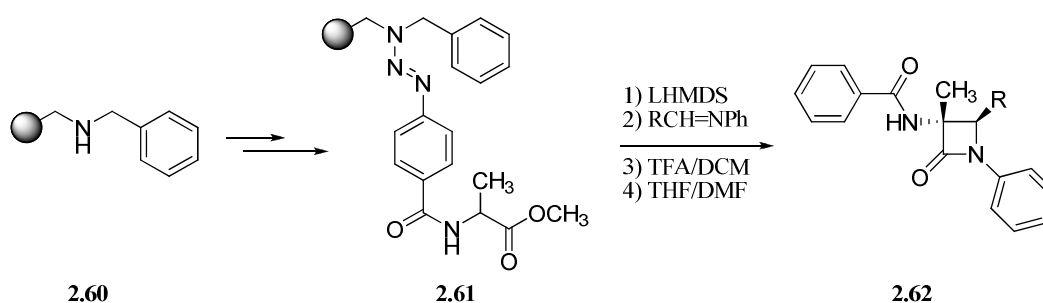
Aunque se han descrito una gran variedad de métodos en disolución para la preparación de β -lactamas diferentemente sustituidas, solo un limitado número de estos protocolos se ha podido aplicar a la química de fase sólida. La gran mayoría de dichos procedimientos utilizan la reacción de Staudinger, diferenciándose entre sí en cuanto a la estrategia de anclaje/escisión seleccionada o al soporte polimérico empleado. Así, en 1996 Gallop *et al.* describieron la primera síntesis en fase sólida de β -lactamas, llevando a cabo reacciones de cicloadición [2+2] entre iminas ancladas a una resina Sasrin y una serie de cetenas generadas *in situ* a partir de los correspondientes cloruros de ácidos y TEA⁹⁷. Transformaciones posteriores de esta primera ruta sintética han permitido la preparación de 2-azetidionas enantioméricamente puras, mediante el empleo de cetenas o iminas quirales⁹⁸⁻¹⁰². En el Esquema 2.9 se muestra un ejemplo de Mata *et al.* en el que la azetidiona **2.59** se sintetiza mediante el procedimiento de Staudinger, tras activación del ácido enantioméricamente puro **2.56** con el reactivo de Mukaiyama y reacción con la imina soportada **2.57**. Recientemente, se ha publicado una variante novedosa de esta metodología empleando un espaciador olefínico en la resina, que permite el desanclaje de las β -lactamas finales mediante una reacción de metátesis cruzada¹⁰³.



Esquema 2.9

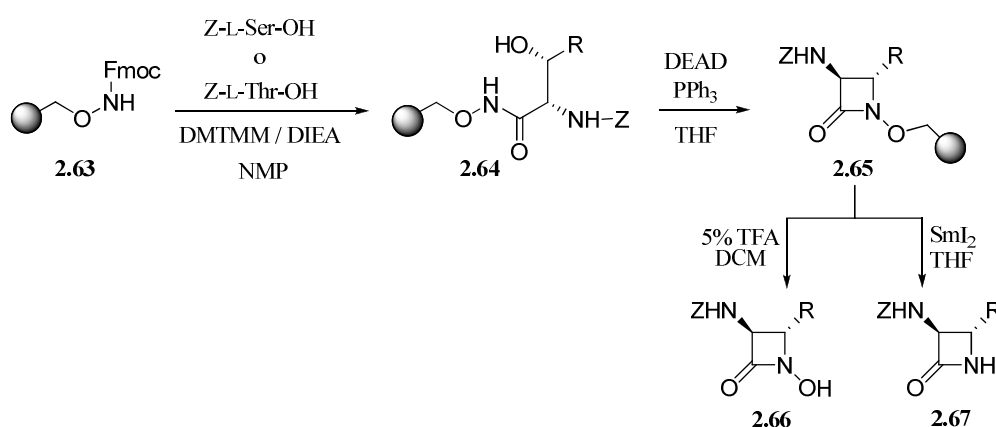
Dentro de los protocolos de síntesis de Staudinger, destaca también la preparación de 2-azetidionas *N*-fenil sustituidas, mediante la reacción de cicloadición sobre un espaciador de tipo benciloxianilina. En este caso, una vez formado el anillo heterocíclico, el tratamiento con CAN da lugar a las correspondientes azetidionas no sustituidas en el átomo de nitrógeno¹⁰⁴.

En cuanto a otras metodologías, cabe señalar que, en nuestro conocimiento, sólo se han descrito dos protocolos que no utilicen la reacción de Staudinger para la preparación del anillo de 2-azetidinona en fase sólida¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. El primero de ellos se basa en la generación de enolatos de aminoésteres, anclados al soporte polimérico a través de un espaciador triazeno, que por reacción de condensación en medio básico con las correspondientes iminas, dan lugar a las β -lactamas esperadas con excelentes diastereoselectividades^{105,106} (Esquema 2.10).



Esquema 2.10

El segundo ejemplo aplica el método de Miller de síntesis de 2-azetidinonas en disolución, que consiste en la ciclación N_1-C_4 en medio básico de β -hidroxiácidos diferentemente sustituidos¹⁰⁷ (Esquema 2.11).

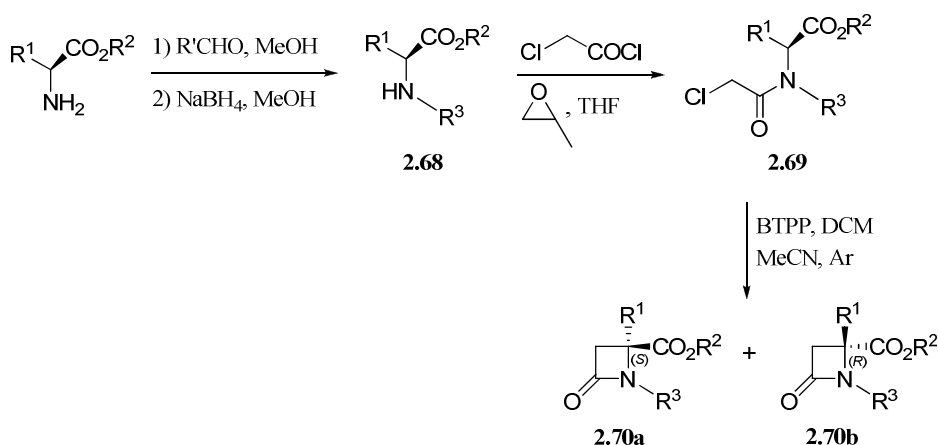


Esquema 2.11

Por último, se ha descrito también el uso de matrices poliméricas solubles, como sistemas de inmovilización adecuados para la preparación de iminas soportadas, precursoras de los correspondientes derivados β -lactámicos mediante reacción de Staudinger o reacciones de condensación imina-enolato¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

2.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Dentro de nuestro interés general en la generación de heterociclos quirales, en nuestro grupo de investigación se puso a punto un método novedoso y versátil para la obtención de β -lactamas 1,4,4-trisustituidas a partir de aminoácidos. El paso clave del proceso desarrollado es la alquilación intramolecular de *N*-bencil-*N*-cloroacetyl derivados de aminoácidos, con formación del enlace C₃-C₄ del anillo de azetidinona^{111,112} (Esquema 2.12).



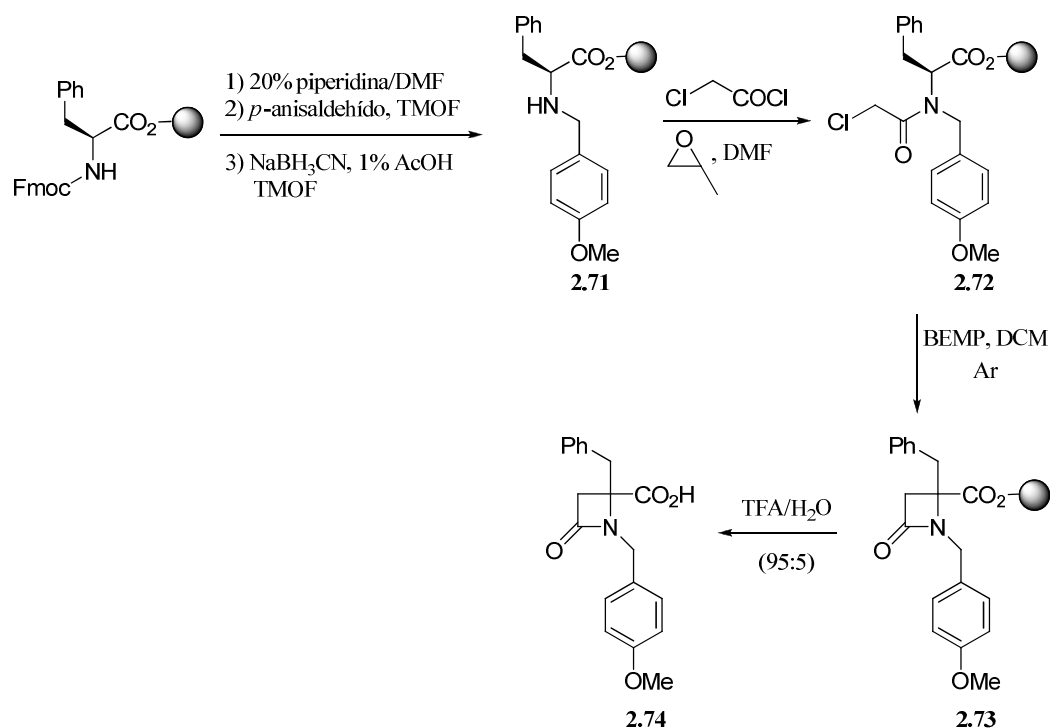
Esquema 2.12

Puesto que la reacción de alquilación intramolecular debe proceder a través de un enolato intermedio, en el que se destruye el centro estereogénico del aminoácido de partida, se esperaba la formación de mezclas racémicas de las 2-azetidinonas correspondientes. Sorprendentemente, para el caso de aminoácidos ramificados en la cadena lateral, como Trp, Phe, Leu y Asp, la ciclación intramolecular de los correspondientes *N*-cloroacetyl derivados transcurrió con enantioselectividad moderada hacia la formación preferente del isómero *S*, llegándose hasta un 56% de exceso enantiomérico en los derivados de Phe¹¹¹. Esta enantioselectividad inesperada sugirió que la ciclación se produce a través de un enolato plano intermedio que posee quiralidad axial, siguiendo el concepto que se conoce como “memoria de quiralidad”¹¹³⁻¹¹⁵. Esta reacción fue ampliamente estudiada con el objetivo de observar la influencia de diferentes

factores en dicho fenómeno de memoria de quiralidad^{116,117}. Se demostró que la ciclación se puede llevar a cabo con una gran variedad de bases y en diferentes disolventes, y que la enantioselectividad depende fundamentalmente del aminoácido de partida, con la cadena lateral (R^1) como elemento principal de estereodirección. También influyen, aunque en menor medida, el sustituyente sobre el nitrógeno y el tipo de éster. Otras variables como la temperatura o la concentración resultaron ser mucho menos significativas para el curso estereoquímico de estas reacciones.

Alternativamente, la síntesis estereoselectiva de estas β -lactamas se llevó a cabo mediante la incorporación de auxiliares quirales en el grupo carboxilato del aminoácido¹¹². En este caso, se demostró que la inducción de asimetría observada era debida exclusivamente a la configuración del auxiliar quiral y que la estereoselectividad no era dependiente del fenómeno de memoria de quiralidad. Por tanto, la influencia del elemento de quiralidad axial, debido a la disustitución sobre el grupo amino del aminoácido, se veía anulado por el(los) centro(s) estereogénico(s) del auxiliar quiral en el éster.

Con objeto de aumentar el valor añadido de estas β -lactamas 1,4,4-trisustituidas se adaptó el protocolo sintético, previamente optimizado para la síntesis en disolución a la síntesis en fase sólida, mediante la unión del grupo carboxilato del aminoácido de partida (Phe) a una resina Wang (Esquema 2.13). La ciclación intramolecular del cloroacetil derivado de Phe anclado a la resina a través del grupo carboxilato **2.72** condujo, tras desanclaje, a la 2-azetidinona esperada **2.74**, aunque con un rendimiento bastante modesto¹¹⁸.



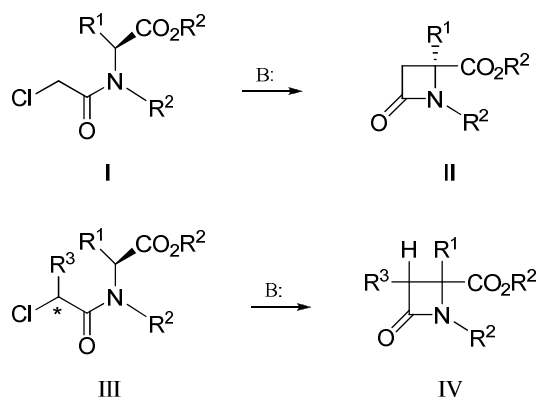
Esquema 2.13

A la vista de todos estos antecedentes es evidente que está aún por demostrar si la presencia de centros estereogénicos en otras partes de los cloroacetildrivados de aminoácidos (como en los sustituyentes sobre el átomo de nitrógeno) tienen o no influencia sobre el proceso de memoria de quiralidad. En este sentido se plantean los objetivos que se indican en el apartado siguiente.

2.3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que en las β -lactamas monocíclicas bioactivas es frecuente la trisustitución en las posiciones 1, 3 y 4, el desarrollo de rutas sintéticas que conduzcan de forma estereoselectiva a la formación de análogos 1,3,4,4-tetrasustituídos podría ser de gran interés dentro del campo de la química médica.

Como se ha comentado en la introducción, la ciclación intramolecular de algunos *N*-bencil-*N*-cloroacetil derivados de aminoácidos (I) condujo a la formación preferente de β -lactamas 1,4,4-trisustituídas (II) de configuración *S*. Partiendo de este razonamiento, se decidió investigar la ciclación de *N*-bencil-*N*-2-cloroalcanoil derivados de aminoácidos enantioméricamente puros (III), y estudiar si era posible la síntesis de las correspondientes β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituídas (IV) de forma estereoselectiva (Esquema 2.14).



Esquema 2.14

Como primera aproximación a la síntesis de las β -lactamas IV, en este capítulo se aborda la preparación y posterior ciclación intramolecular en medio básico de diferentes *N*-bencil-*N*-2-cloropropionil derivados de aminoácidos enantioméricamente puros (III, R³ = Me). Con ello, se persiguen varios objetivos principales:

1. Estudiar si las β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas IV pueden obtenerse mediante un procedimiento similar al de sus correspondientes análogos 1,4,4-trisustituidos.
2. Evaluar la influencia del centro estereogénico adicional del grupo 2-cloropropionilo en el fenómeno de memoria de quiralidad observado en la síntesis de los compuestos trisustituidos II.
3. Supeditado a la consecución del objetivo 1, estudiar la posibilidad de adaptación del protocolo previamente optimizado para la síntesis de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas en disolución a la química de fase sólida, para poder agilizar la preparación de colecciones de compuestos basadas en este esqueleto heterocíclico.
4. Buscar actividades biológicas para los derivados β -lactámicos preparados, a través de programas de cribado disponibles en los laboratorios de grupos colaboradores.

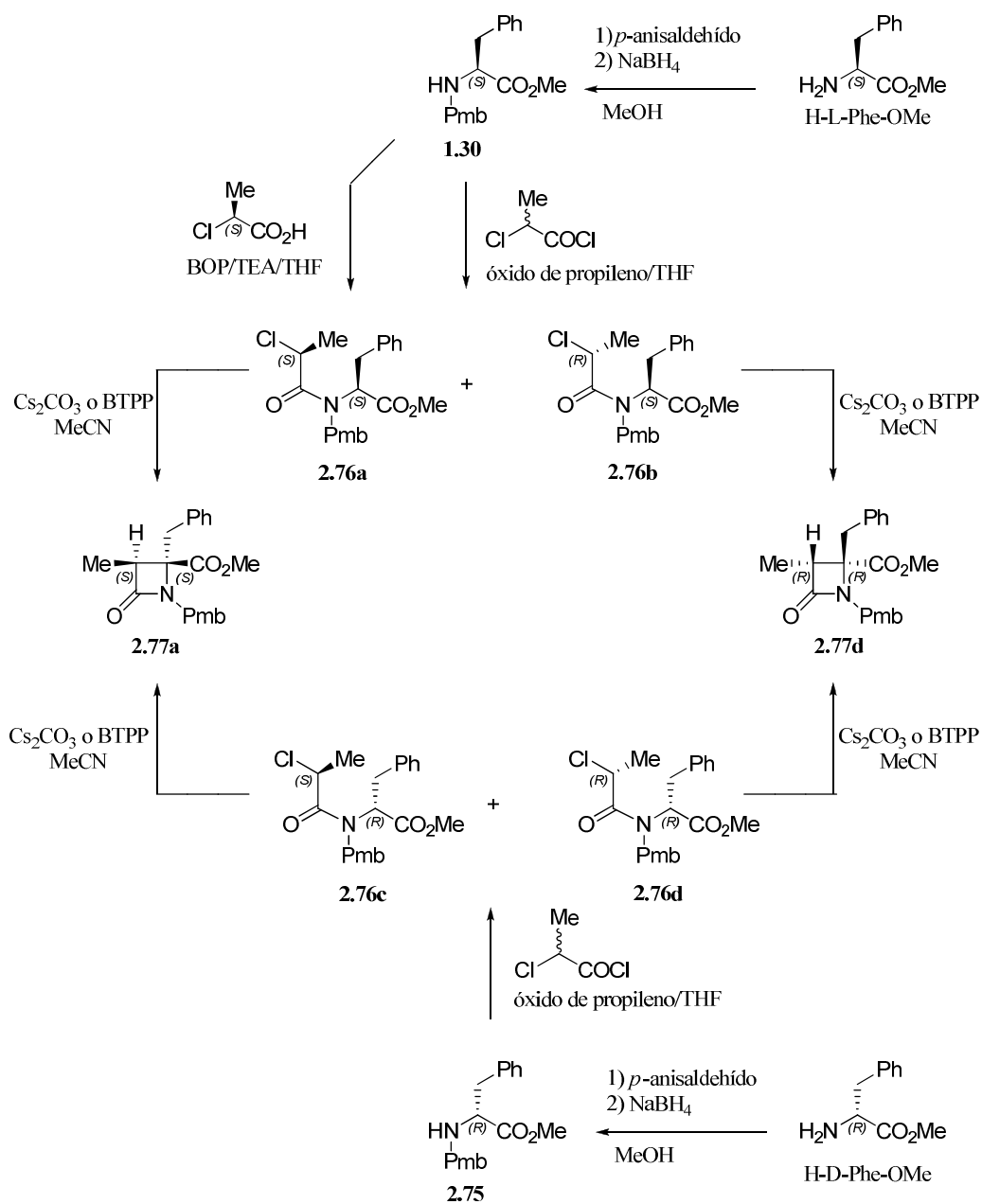
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Síntesis en disolución de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas

2.4.1.1. Desarrollo del esquema sintético

Para llevar a cabo la preparación de los derivados β -lactámicos objetivo se siguió un procedimiento paralelo al desarrollado por nuestro grupo de investigación, anteriormente comentado en la introducción. La ruta sintética comienza con la preparación de los *N-p*-metoxibencil derivados de aminoácidos. Como aminoácido de partida para el primer estudio exploratorio se escogió Phe, debido a que su respectivo *N*-cloroacetyl derivado se convertía en la correspondiente azetidinona de forma enantioselectiva en base al fenómeno de memoria de quiralidad⁹⁴. Para poder estudiar el curso estereoquímico de la ciclación de los *N*-2-cloropropionil-*N-p*-metoxibencil derivados de Phe a las correspondientes β -lactamas era necesario disponer de los cuatros posibles diastereoisómeros. Para ello fue necesario utilizar derivados de Phe tanto de la serie L como de la D.

Como se indica en el Esquema 2.15, los *N-p*-metoxibencil derivados **1.30** y **2.75** se obtuvieron mediante la reacción de H-L-Phe-OMe o H-D-Phe-OMe con *p*-metoxibenzaldehído, seguido de la reducción de la imina intermedia con NaBH₄. Esta reacción de aminación reductora transcurrió con buen rendimiento en ambos casos. La reacción posterior del derivado **1.30** con cloruro de cloropropionilo racémico, en presencia de óxido de propileno como captador de hidrácido, dio lugar a la pareja de diastereoisómeros **2.76a** y **2.76b** que pudieron separarse fácilmente mediante cromatografía en columna. La asignación inequívoca de la configuración de los diastereoisómeros obtenidos se realizó mediante la preparación del derivado **2.76a** por reacción de **1.30** con ácido 2(*S*)-cloropropiónico, empleando BOP como agente de acoplamiento y TEA como base. Esta reacción transcurrió con un rendimiento mucho más bajo que la acilación con el cloruro de ácido, observándose además una pequeña racemización (5%) del ácido 2(*S*)-cloropropiónico. Por esta razón, y debido a la facilidad de la separación cromatográfica, el cloruro de cloropropionilo racémico se empleó también para la obtención de los derivados diastereoisoméricos **2.76c** y **2.76d** a partir de **2.75**.



Esquema 2.15

Es de resaltar que en los espectros de ^1H RMN de los derivados **2.76a-d**, cada uno de los protones del grupo $N\text{-CH}_2$ aparecen como un doblete en el entorno de 3.9-4.5 ppm. La señal de protón $\alpha\text{-H}$ Phe aparece próxima a 4 ppm. El doblete característico del grupo 2'-metilo aparece en el entorno de 1.6 ppm y la señal del protón 2'-H próxima a 4.4 ppm.

En los espectros de ^{13}C RMN aparecen como señales más características a destacar las correspondientes al carbono $\alpha\text{-C}$ (~60 ppm), el grupo 2'-metilo en el entorno de 20 ppm, el carbono 2'-C aproximadamente a 50 ppm y el grupo $N\text{-CH}_2$ a 52 ppm.

Ambos espectros mostraron además la existencia de rotámeros del enlace amida, asignándose el rotámero mayoritario en estas mezclas como *trans* por analogía con los *N*-cloroacetil derivados de aminoácido (Figura 2.10).

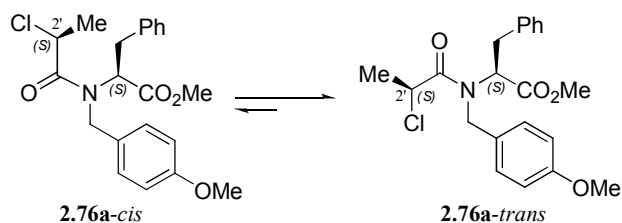


Figura 2.10. Rotámeros *cis/trans* del compuesto **2.76a**

Una vez preparados todos los cloropropionil derivados (**2.76a-d**), se procedió a la síntesis de las correspondientes β -lactamas mediante ciclación intramolecular en medio básico de cada uno de los diastereoisómeros. La reacción se llevó a cabo en acetonitrilo seco y empleando como base BTPP o Cs_2CO_3 (Esquema 2.15). La ciclación intramolecular de cada uno de los diastereoisómeros dio como resultado la formación de una única β -lactama 3,4-*cis* sustituida en cada caso. Este hecho pone de manifiesto el alto grado de diastereoselectividad de la reacción. Independientemente del centro estereogénico del carbono α -Phe, los cloropropionil derivados con idéntica configuración en posición 2' dieron lugar a la misma azetidinona. Así, a partir de los compuestos **2.76a** y **2.76c**, ambos con configuración *S* en posición 2', se obtuvo la 3*S*,4*S*-azetidinona **2.77a** con rendimientos del 70% y 64%, respectivamente. Por otra parte, los derivados **2.76b** y **2.76d**, de configuración *R* en 2', dieron lugar a la formación de la 3*R*,4*R*-azetidinona

2.77d con rendimientos del 66% y 69%, respectivamente. Estos resultados experimentales indican que esta transformación transcurre con un enantiocontrol exquisito, que está regido única y exclusivamente por la configuración del centro estereogénico del grupo cloropropionilo y que es completamente independiente de la configuración del aminoácido de partida. Por tanto, en esta transformación la inducción de asimetría debida a memoria de quiralidad no tiene lugar.

En los espectros de ^1H -RMN de las β -lactamas **2.77a** y **2.77d** se observó la desaparición del protón α -H Phe de los cloropropionil derivados de partida, así como el cambio de multiplicidad de los protones β -H del residuo de Phe. Del mismo modo, en los espectros de ^{13}C -RMN se observó la desaparición de la señal debida al carbono α -CH y la presencia de un nuevo carbono cuaternario, en el entorno de 68 ppm, asignado al C-4 de la β -lactama.

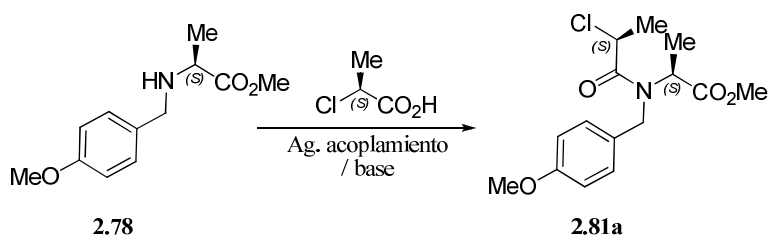
Para evaluar la pureza enantiomérica de las azetidionas obtenidas se empleó HPLC quiral, determinándose excesos enantioméricos del 98% para **2.77a** y 93% para **2.77d**.

Con objeto de estudiar con mayor profundidad esta reacción y de evaluar la versatilidad de la metodología sintética, se decidió extender la síntesis de estas β -lactamas empleando otros aminoácidos como producto de partida. Se eligieron Ala, Lys y Glu como representantes de aminoácidos con cadenas laterales alifática, básica y ácida, respectivamente.

La síntesis de estos compuestos se realizó siguiendo el mismo procedimiento empleado anteriormente para los derivados de Phe, siendo el primer paso la obtención de los correspondientes *p*-metoxibencil derivados, seguido de la acilación con el cloruro de ácido racémico para dar lugar a los 2-cloropropionil derivados como mezclas de diastereoisómeros. Desafortunadamente, en estos casos la dificultad en la separación cromatográfica de las parejas de diastereoisómeros aconsejó estudiar con detalle la reacción de acoplamiento entre los *p*-metoxibencil derivados de aminoácidos y los ácidos (*S*) y (*R*) 2-cloropropiónicos enantioméricamente puros. Para ello se seleccionó el derivado de Ala (**2.78**) y el ácido 2(*S*)-cloropropiónico y se estudiaron diferentes condiciones de reacción, empleándose diversos agentes de acoplamiento y bases

(Esquema 2.16). El objetivo de este estudio era encontrar las condiciones en las que la reacción de acilación transcurriera con el mayor rendimiento posible, mientras que la epimerización en el producto final fuese mínima.

En la Tabla 2.1 se recogen los diferentes ensayos realizados, así como los valores de conversión y el exceso diastereoisomérico del producto final, ambos expresados en porcentaje.



Esquema 2.16

Tabla 2.1. Agentes de acoplamiento y bases empleados en la reacción entre **2.78** y el ácido 2(*S*)-cloropropiónico.

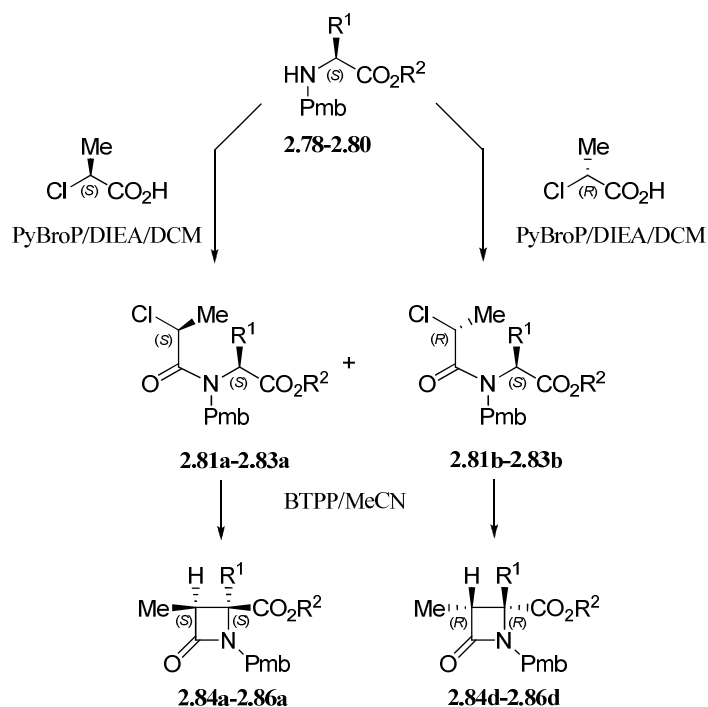
Agente de acoplamiento	Base	Exceso diastereoisomérico ^a (%)	Conversión ^b (%)
BOP	TEA	95	34
	DIEA	97	45
	Colidina	97	25
	2,6-Lutidina	98	22
PyBroP	DIEA	94	76
	Colidina	95	58
	2,6-Lutidina	95	46
BroP	DIEA	93	48
HATU		96	31
PyAOP		95	27
BTC		67	8
TFFH		94	46
PyBOP/HOAt		87	11

^a La proporción **2.81a:2.81b** se midió por HPLC (columna Novapak, A:B = 35:65).

^b A partir de los cromatogramas de los crudos de reacción tras 48h.

Como se recoge en la Tabla 2.1, los mejores resultados combinados en cuanto a rendimiento de producto final y estereoselectividad se consiguieron empleando PyBroP

como agente de acoplamiento y DIEA como base. Por ello, éstas fueron la condiciones seleccionadas para llevar a cabo la síntesis de los cloropropionil derivados **2.81-2.83**.



Compuesto	R ¹	R ²
2.78, 2.81a, 2.81b, 2.84a, 2.84d	CH ₃	CH ₃
2.79, 2.82a, 2.82b, 2.85a, 2.85d	(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₃
2.80, 2.83a, 2.83b, 2.86a, 2.86d	(CH ₂) ₂ CO ₂ ^t Bu	^t Bu

Esquema 2.17

Los compuestos **2.81a-2.83a** y **2.81b-2.83b** se obtuvieron tras el acoplamiento, en las condiciones indicadas de los *p*-metoxibencil derivados **2.78-2.80** con los ácidos 2(*S*) y 2(*R*)-cloropropiónico, respectivamente (Esquema 2.17). Los excesos diastereoisoméricos obtenidos en cada caso se midieron en los cromatogramas de HPLC y se hallan recogidos en la Tabla 2.2. Cabe señalar que en el caso de los derivados de Glu, **2.83a** y **2.83b**, fue posible separar mediante cromatografía en columna ambos diastereoisómeros en forma pura.

Tabla 2.2. Excesos diastereoisoméricos obtenidos en los cloropropionil derivados.

R ¹	R ²	Configuración	Compuesto	Exceso diastereoisomérico ^a (%)
CH ₃	CH ₃	(S,S)	2.81a	96 ^b
		(R,S)	2.81b	92 ^b
(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₃	(S,S)	2.82a	83 ^c
		(R,S)	2.82b	81 ^c
(CH ₂) ₂ CO ₂ ^t Bu	^t Bu	(S,S)	2.83a	98 ^{d,e}
		(R,S)	2.83b	98 ^{d,e}

^a La proporción **a:b** se midió por HPLC en los crudos de reacción (columna Novapak, ^bA:B = 35:65, ^cA:B = 45:55, ^dA:B = 40:60).

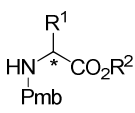
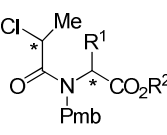
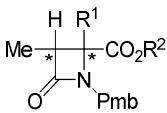
^e Tras purificación cromatográfica

El patrón de señales de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN en los compuestos **2.81a-2.83a** y **2.81b-2.83b** fue similar al comentado previamente para el caso de los cloropropionil derivados de Phe, con la particularidad de los protones específicos de cada cadena lateral (Ala, Lys, Glu), y los de los grupos protectores Boc y ^tBu en los casos de Lys y Glu, respectivamente.

La ciclación intramolecular de los derivados **2.81a-2.83a** y **2.81b-2.83b** dió lugar a las correspondientes β-lactamas **2.84a-2.86a** y **2.84d-2.86d**, respectivamente. Al igual que en el caso de los derivados de Phe, se obtuvo una única β-lactama a partir de cada uno de los cloropropionil derivados, lo que demuestra la generalidad y versatilidad del procedimiento desarrollado para la síntesis altamente enantioselectiva de azetidinonas 1,3,4,4-tetrasustituidas.

En la Tabla 2.3 se recogen a modo de resumen los compuestos preparados en este apartado y el rendimiento obtenido en cada caso.

Tabla 2.3. Resumen de los compuestos preparados y rendimiento obtenidos.

Derivado	R ¹	R ²	Configuración	Compuesto	Rdto (%) ^a
	CH ₂ Ph	CH ₃	(<i>R</i>)	2.75	82
	CH ₃	CH ₃	(<i>S</i>)	2.78	84
	(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₃	(<i>S</i>)	2.79	87
	(CH ₂) ₂ CO ₂ ^t Bu	^t Bu	(<i>S</i>)	2.80	80
	CH ₂ Ph	CH ₃	(<i>S,S</i>)	2.76a	48
			(<i>R,S</i>)	2.76b	42
			(<i>S,R</i>)	2.76c	40
			(<i>R,R</i>)	2.76d	52
	CH ₃	CH ₃	(<i>S,S</i>)	2.81a	53
			(<i>R,S</i>)	2.81b	50
	(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₃	(<i>S,S</i>)	2.82a	70
			(<i>R,S</i>)	2.82b	52
	(CH ₂) ₂ CO ₂ ^t Bu	^t Bu	(<i>S,S</i>)	2.83a	52
			(<i>R,S</i>)	2.83b	65
	CH ₂ Ph	CH ₃	(<i>S,S</i>)	2.77a	70/64 ^b
			(<i>R,R</i>)	2.77d	66/69 ^c
	CH ₃	CH ₃	(<i>S,S</i>)	2.84a	66
			(<i>R,R</i>)	2.84d	54
	(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₃	(<i>S,S</i>)	2.85a	67
			(<i>R,R</i>)	2.85d	77
	(CH ₂) ₂ CO ₂ ^t Bu	^t Bu	(<i>S,S</i>)	2.86a	48
			(<i>R,R</i>)	2.86d	54

^aRendimiento del producto aislado. ^b**2.77a** se obtuvo a partir de **2.76a** (70%) y **2.76c** (64%).

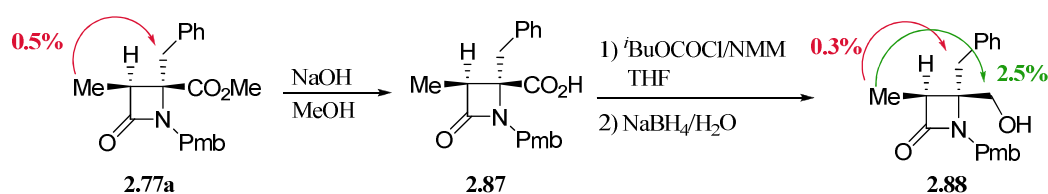
^c**2.77d** se obtuvo a partir de **2.76b** (66%) y **2.76d** (69%).

2.4.1.2. Asignación de la configuración en las β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas

La asignación de la configuración absoluta en las β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas descritas se llevó a cabo mediante dos procedimientos :

- Experimentos NOE.
- Síntesis de derivados dipeptídicos.

Mediante la realización de experimentos NOE, se pudo determinar la disposición relativa *cis/trans* de los sustituyentes en las posiciones 3 y 4 de la β -lactama. Se comenzó el estudio con las azetidinonas derivadas de Phe. En este caso no pudo estudiarse directamente la correlación entre el protón 3-H y los del grupo 4-CH₂ porque ambas señales salían muy próximas en el espectro de ¹H-RMN. En el compuesto **2.77a** existía un efecto NOE (0.5%) entre el grupo metilo (3-CH₃) y los protones 4-CH₂, que en un principio sugirió que estos dos grupos estuviesen dispuestos hacia el mismo lado en el anillo de azetidinona. Para poder asignar con mayor seguridad la configuración en este derivado β -lactámico se decidió llevar a cabo la reducción del éster metílico en posición 4 al correspondiente alcohol (Esquema 2.18). Para ello, el primer paso consistió en la saponificación del éster en medio básico para dar lugar al ácido carboxílico **2.87**. A continuación se trató este ácido con cloroformiato de isobutilo en presencia de NMM, para dar lugar al correspondiente anhídrido mixto, que tras reducción con NaBH₄ en medio acuoso condujo al alcohol deseado **2.88** con buen rendimiento.

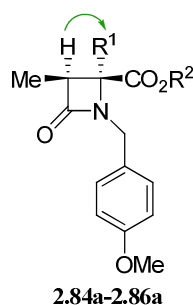


Esquema 2.18

En el derivado **2.88** se observó de nuevo un efecto NOE débil (0.3%) entre los protones del grupo metilo en posición 3 y los del grupo 4-CH₂. Sin embargo, este efecto era mucho más fuerte (2.5%) entre dicho grupo metilo y los protones metilénicos del grupo 4-hidroximetilo, lo que indica que estos dos grupos se disponen hacia la misma

cara en el anillo β -lactámico. Por tanto, en la azetidinona de partida **2.77a** el éster metílico y el grupo metilo tienen una disposición relativa *cis*.

En los restantes derivados β -lactámicos pudo observarse directamente el efecto NOE entre los protones 3-H y los del grupo 4-CH₂, corroborándose en todos los casos una disposición espacial *cis* entre ellos (Esquema 2.19).



Compuesto	R ¹	R ²	NOE (%)
2.84a	CH ₃	CH ₃	3.6
2.85a	(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₃	4.2
2.86a	(CH ₂) ₂ CO ₂ ^t Bu	^t Bu	9.1

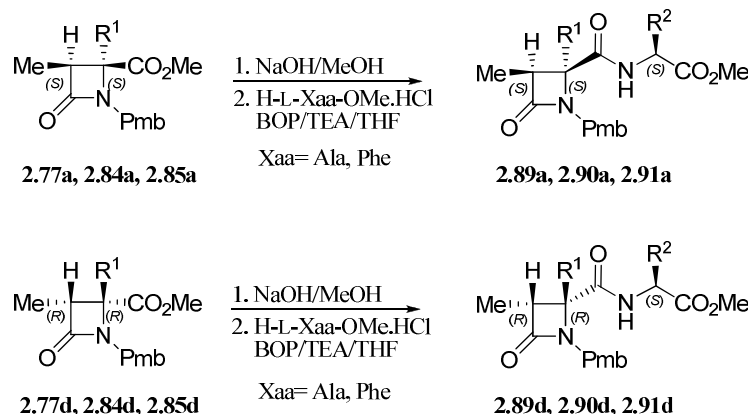
Esquema 2.19

Una vez conocida la relación *cis* entre los sustituyentes en posiciones 3 y 4 de las β -lactamas era necesario asignar la configuración absoluta de los centros estereogénicos de las mismas.

Existen estudios de ¹H-RMN sobre dipéptidos y pseudodipéptidos diastereoisoméricos, compuestos por un aminoácido aromático y otro alifático, que han demostrado que los protones del grupo β -metilo o β -metileno del residuo alifático aparecen más apantallados en los derivados heteroquirales (L-D o D-L) que en sus análogos homoquirales (L-L o D-D)¹¹⁰. Asimismo, se ha descrito que en este tipo de compuestos, los derivados heteroquirales se retienen más en HPLC que sus análogos homoquirales¹¹¹. Partiendo de estos precedentes, se decidió preparar derivados dipeptídicos de las β -lactamas sintetizadas como herramienta para la asignación de su configuración.

Para la preparación de los dipéptidos diastereoisoméricos apropiados se siguió un protocolo experimental que implicó la hidrólisis del grupo 4-carboxilato y el acoplamiento peptídico posterior con H-L-Ala-OMe o con H-L-Phe-OMe, de manera que se generen siempre derivados dipeptídicos constituidos por un aminoácido aromático y otro alifático. De este modo, tras la saponificación del éster metílico ($R^1 = \text{Me}$), se prepararon los dipéptidos **2.89a-2.91a** y **2.89d-2.91d**, por reacción de las 4-carboxi-2-azetidinonas con H-L-Ala-OMe o H-L-Phe-OMe, empleando BOP como agente de acoplamiento y TEA como base (Esquema 2.20). Cada uno de estos dipéptidos se obtuvo con buen rendimiento como un único diastereoisómero.

La asignación de la configuración absoluta en C-4 de estos derivados dipeptídicos se realizó en base a los desplazamientos químicos, medidos en los espectros de ^1H -RMN, y a los respectivos tiempos de retención, extraídos de los cromatogramas de HPLC. Como puede observarse en la Tabla 2.4, los desplazamientos químicos de los protones β -H del residuo alifático en los derivados **2.89a-2.91a** son más altos que para los correspondientes protones en los derivados **2.89d-2.91d**. Por otra parte, los compuestos **2.89d-2.91d** presentan tiempos de retención mayores en el HPLC. Con estos datos se puede concluir que los compuestos **2.89a-2.91a** son los dipéptidos homoquirales, y que por tanto las β -lactamas precursoras **2.77a**, **2.84a** y **2.85a** poseen configuración 3*S*, 4*S*. Del mismo modo los derivados dipeptídicos **2.89d-2.91d** son heteroquirales y las azetidinonas de partida **2.77d**, **2.84d** y **2.85d** presentan configuración 3*R*, 4*R*. Es de destacar que en los compuestos **2.90a-2.91a** el grupo metilo (3-CH₃) aparece notoriamente más apantallado que en los diastereoisómeros **2.90d-2.91d**. Este efecto podría deberse a la corriente de anillo del grupo fenilo del residuo de Phe, que en los dipéptidos homoquirales se dispone hacia el mismo lado del anillo β -lactámico ocupado por el grupo 3-CH₃.



Esquema 2.20

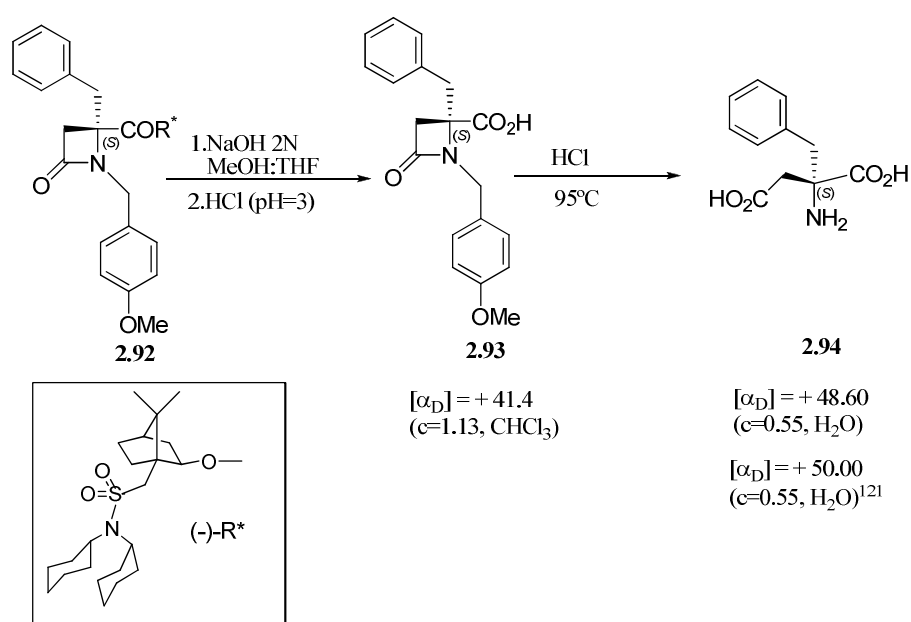
Tabla 2.4. Desplazamientos químicos y tiempos de retención de los derivados dipeptídicos **2.89-2.91**.

Compuesto	Rdto (%) ^a	R ¹	R ²	δ β -H ^b (ppm)	δ 3-CH ₃ ^b (ppm)	t_R HPLC ^c (min)
2.89a	66	CH ₂ Ph	CH ₃	0.84	1.08	13.34 ^d
2.89d	70	CH ₂ Ph	CH ₃	0.71	1.13	15.02 ^d
2.90a	69	CH ₃	CH ₂ Ph	1.46	0.73	13.20 ^e
2.90d	45	CH ₃	CH ₂ Ph	1.37	1.16	15.25 ^e
2.91a	63	(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₂ Ph	1.85	0.63	7.89 ^f
2.91d	63	(CH ₂) ₄ NHBoc	CH ₂ Ph	1.70	1.07	8.35 ^f

^a Rendimiento del producto aislado ^b 300 MHz, CDCl₃ ^c HPLC en condiciones isocráticas (columna Novapak, ^dA:B = 40:60, ^eA:B = 35:65, ^fA:B = 45:55).

La validez de esta regla de los dipéptidos en los derivados de β -lactamas 1,4,4-trisustituidas derivadas de Phe fue comprobada anteriormente en nuestro grupo de investigación de manera inequívoca, mediante la transformación de una de estas β -lactamas en un derivado de ácido aspártico conocido¹¹². Así, el tratamiento de **2.93** con HCl concentrado a 95°C durante 24 h condujo al ácido (*S*)- α -bencil aspártico **2.94** (Esquema 2.21), cuya configuración absoluta había sido previamente determinada por el grupo del Prof. Juaristi mediante cristalografía de rayos X¹²¹. La medida del valor de rotación óptica del producto **2.94** y su comparación con el dato publicado por el mencionado grupo, permitió confirmar que las asignaciones tentativas, previamente

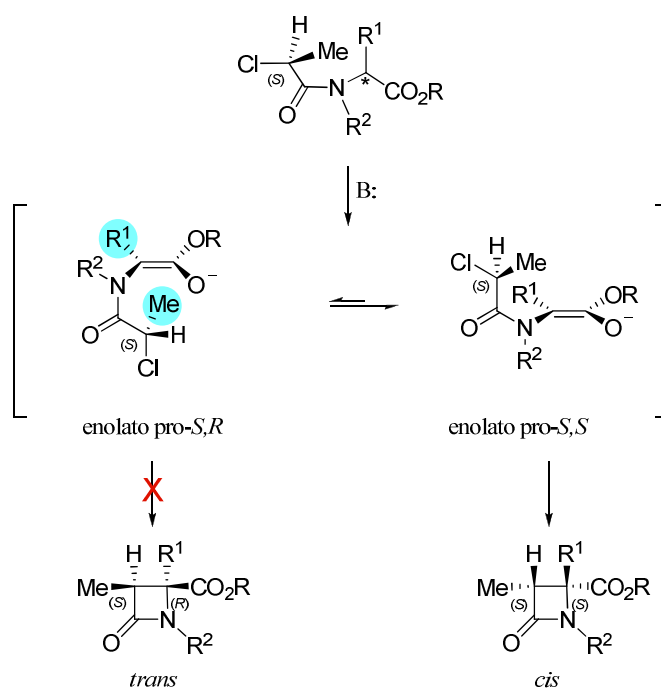
realizadas en base a los dipéptidos eran correctas en el caso de los derivados de Phe. Partiendo de este resultado, se ha extrapolado que otros análogos dipeptídicos β -lactámicos similares también siguen las reglas anteriormente mencionadas en cuanto a desplazamientos químicos y tiempos de retención.



Esquema 2.21

2.4.1.3. Estudio del mecanismo de formación de las β -lactamas

El procedimiento sintético desarrollado para la síntesis enantioselectiva de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas a partir de aminoácidos, tiene como paso clave el proceso de alquilación intramolecular, con formación del enlace C₃-C₄, a partir de los correspondientes *N*-2-cloropropionil derivados. Esta etapa debe transcurrir a través de la formación de un enolato intermedio, en el que la configuración del residuo de cloropropionilo dicta el curso estereoquímico de la ciclación.

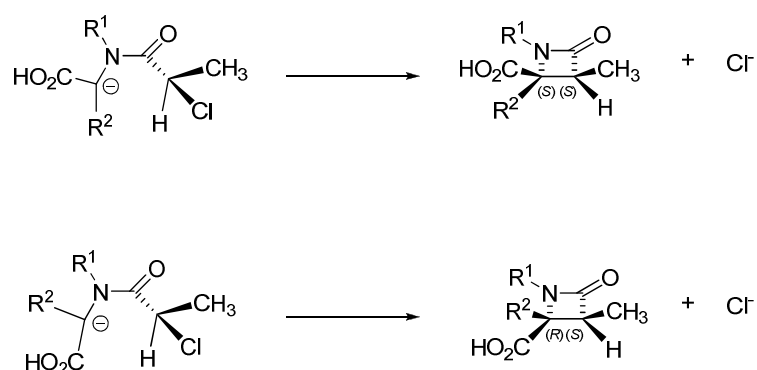


Esquema 2.22

Como se recoge en el Esquema 2.22, a partir de los 2(*S*)-cloropropionil derivados de aminoácidos podrían formarse dos posibles enolatos: el enolato pro-*S,R*, que daría lugar a la β -lactama *trans*, y el enolato pro-*S,S* que conduciría a la formación de la β -lactama *cis*. En el caso del enolato pro-*S,R* la aproximación entre el resto cloropropionilo y el enolato presenta mayor impedimento estérico puesto que la cadena lateral del aminoácido R^1 y el metilo se orientan en el mismo plano. La

proximidad espacial de estos grupos debería desestabilizar al enolato precursor pro- S,R , lo que podría justificar que solamente se forme la β -lactama de configuración *cis* a través del enolato pro- S,S . Un razonamiento similar sería aplicable a los enolatos provenientes de los derivados de 2(R)-cloropropionilo.

Con el objetivo de analizar con mayor profundidad el mecanismo de esta reacción, se han realizado estudios teóricos (*ab initio*) sobre modelos simplificados de la misma.



Modelo	R^1	R^2	Estereoquímica
I	H	Me	R,S
	H	Me	S,S
II	Me	Me	R,S
	Me	Me	S,S
III	Me	H	R,S
	Me	H	S,S

Esquema 2.23

En el Esquema 2.23 se recogen los modelos simplificados de la reacción que fueron estudiados teóricamente. El modelo I posee un hidrógeno (R^1) unido al nitrógeno y un metilo (R^2) en la posición que ocuparía la cadena lateral del aminoácido. En el modelo II ambos sustituyentes son grupos metilo. Los modelos I y

II se corresponden con derivados de Ala. Por último, el modelo III, tiene un metilo como R¹ y un hidrógeno en lugar de la cadena lateral, lo que se corresponde con un derivado de Gly. En la Figura 2.11, se muestra la geometría de las estructuras optimizadas correspondientes al modelo I.

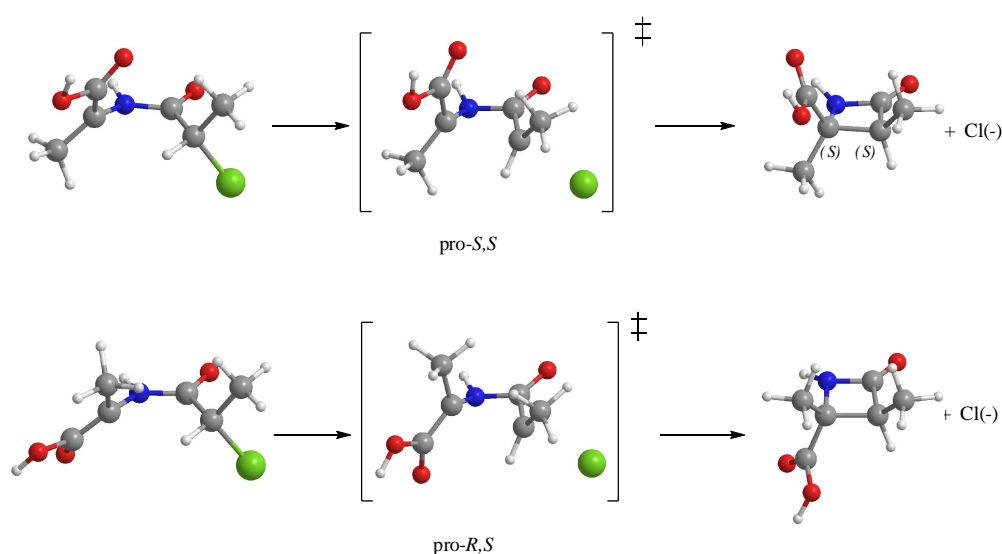


Figura 2.11. Estados estacionarios obtenidos en el modelo I

Tabla 2.5. Valores de energía relativa de las estructuras en los modelos estudiados.

Modelo	R ¹ /R ² (configuración)	Energía relativa (KJ/mol)		
		Inicial	E. transición	Final
I	H/Me (R,S)	13.87	77.65	-30.42
	H/Me (S,S)	0.00	63.85	-31.33
II	Me/Me (R,S)	13.00	65.73	-46.96
	Me/Me (S,S)	0.00	52.72	-48.20
III	Me/H (R,S)	6.45	61.92	-44.17
	Me/H (S,S)	0.00	56.62	-41.75

Los valores de energía relativa de los estados estacionarios de los modelos estudiados se encuentran recogidos en la Tabla 2.5. En cada modelo, la conformación

inicial más estable se ha utilizado como valor de referencia para calcular la energía relativa del resto de las especies implicadas en la reacción.

Como se observa en los datos obtenidos, la presencia de un hidrógeno o un grupo metilo unidos al nitrógeno amídico (posición R^1 en modelos I y II) no cambia significativamente las diferencias energéticas obtenidas en las dos vías de la reacción que se están estudiando. Los resultados muestran que la estructura inicial que lleva a la β -lactama de configuración S,S es la más estable en todos los casos. La diferencia de energía depende en gran medida del sustituyente R^2 . Cuando R^2 es un metilo la diferencia es de aproximadamente unos 13 KJ/mol, mientras que cuando R^2 es un hidrógeno (Gly) la diferencia se reduce a 6.5 KJ/mol. Una tendencia similar se observa en el caso de las energías relativas de los estados de transición, con diferencias de energía de aproximadamente 13 y 5 KJ/mol para $R^2 = \text{Me}$ (modelos I y II) y $R^2 = \text{H}$ (modelo III), respectivamente.

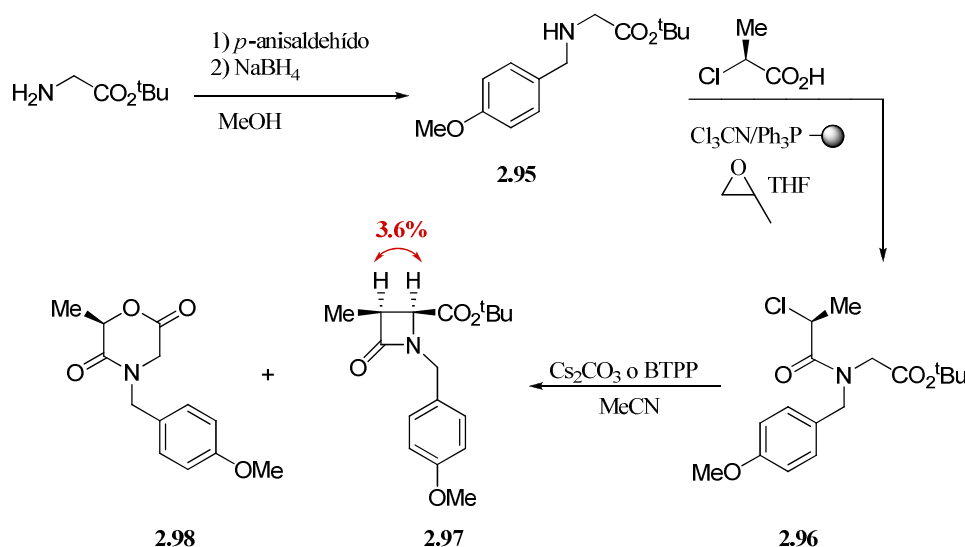
Los valores de energía negativos en las estructuras finales indican que la reacción es exotérmica. Además, la estabilidad relativa entre las β -lactamas finales de configuración S,S y R,S se reduce hasta 1 KJ/mol en los derivados de Ala. Como era de esperar, en caso de que R^2 sea hidrógeno (modelo III), el isómero *trans*- R,S es más estable que el de configuración *cis*- S,S .

Las β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas derivadas de aminoácidos sintetizadas en este trabajo se ajustan al modelo II desarrollado en los cálculos teóricos. De este modo, los datos obtenidos en el estudio teórico de la reacción apoyan los datos experimentales y la diferencia de energía de los estados de transición justifica la formación exclusiva de las β -lactamas *cis*. En todos los casos, el estado de transición que coloca el grupo 2'-metilo y la cadena lateral del aminoácido del mismo lado está claramente desfavorecido.

Aunque en el caso del modelo III la azetidinona más estable es la de configuración R,S , las energías relativas en los precursores y en el estado de transición son mas favorables también para la ruta que conduce a la β -lactama de configuración S,S . Este hecho podría aprovecharse para la síntesis estereoselectiva de β -lactamas 3-alkil-4-carboxi sustituidas, utilizando derivados de Gly como productos de partida.

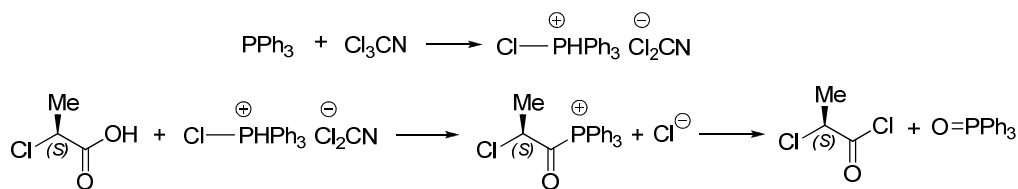
2.4.1.4. Síntesis y estudio de β -lactamas 1,3,4-trisustituidas derivadas de glicina

El primer paso de la secuencia sintética, al igual que en los derivados anteriores es la obtención del *N*-*p*-metoxibencil derivado **2.95**, mediante reacción de aminación reductora a partir del aminoácido comercial H-Gly-O^tBu (Esquema 2.24).



Esquema 2.24

La obtención del *N*-cloropropionil derivado **2.96** se realizó en este caso mediante un procedimiento diferente, con objeto de evitar la racemización en el centro estereogénico del residuo de 2-cloropropionilo. Este nuevo método, que se comentará mas detalladamente en el apartado 2.4.2, se basa en la generación *in situ* del cloruro del ácido 2(*S*)-cloropropiónico empleando tricloroacetnitrilo como agente clorante y trifenilfosfina soportada sobre polímero (Esquema 2.25)^{122,123}. Posteriormente este cloruro de ácido se hace reaccionar con el compuesto **2.95**, en presencia de óxido de propileno que actúa como agente captador de hidrácido. La ausencia de base a lo largo de todo el proceso debe garantizar la preservación del centro estereogénico del ácido 2-cloropropiónico de partida.



Esquema 2.25

Siguiendo el procedimiento indicado, el *N*-cloropropionil derivado **2.96** se obtuvo con rendimiento moderado (32%). En el espectro de ^1H RMN de este compuesto, los protones del grupo *N*-CH₂ aparecen en el entorno de 4.5-4.7 ppm. Las señales de los protones α -Gly resuenan a 3.8 y 3.9 ppm. El doblete característico del grupo metilo del residuo de 2-cloropropionilo aparece a 1.7 ppm y la señal del protón 2-H está próxima a 4.6 ppm. En el espectro de ^{13}C RMN aparecen como señales más características las correspondientes al carbono α -C a 47.9 ppm, el grupo metilo resuena a 21 ppm, el carbono 2-C aproximadamente a 49 ppm y grupo *N*-CH₂ a unas 51 ppm. Estos espectros mostraron además la existencia de isomería alrededor del enlace amida, con una relación de rotámeros *cis/trans* casi al 50%, mucho más alta que para los derivados anteriormente comentados.

La ciclación intramolecular del derivado **2.96** empleando como base BTTP o Cs₂CO₃, dió lugar a la formación de una única β -lactama, **2.97**. Con BTTP la reacción transcurrió más lentamente y con un rendimiento mucho más bajo (22%) que para los restantes derivados y se observó la formación del producto de *O*-alquilación **2.98** (8%). Utilizando Cs₂CO₃ la reacción fue tan lenta que tras 30 días de reacción sólo un 7% del producto de partida se había transformado en la β -lactama **2.97**.

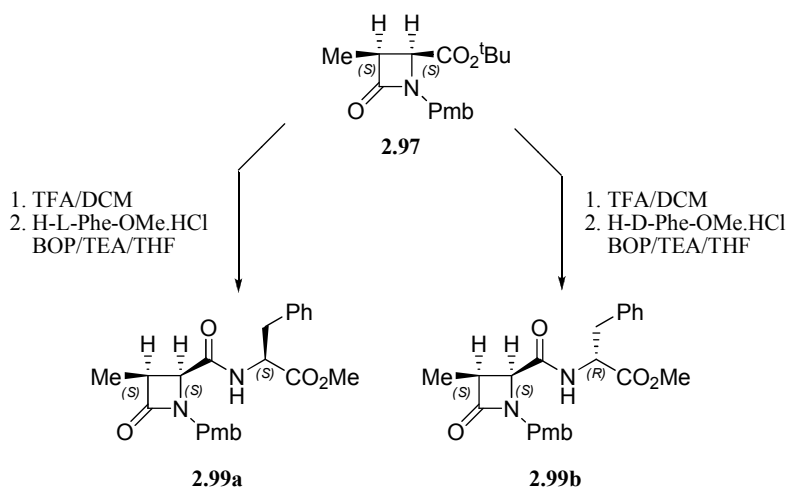
En el espectro de ^1H -RMN de la β -lactama **2.97** se observó la desaparición de uno de los protones α -Gly del derivado de partida, así como el cambio de multiplicidad del protón 3-H del anillo de β -lactama. Los protones 4-H y 3-H muestran una constante de acoplamiento de 5.6 Hz, que es característica de protones que tienen una disposición relativa *cis* en anillos β -lactámicos⁷². En el espectro de ^{13}C -RMN aparece la señal del carbono 4-C a 53.4 ppm.

Mediante la realización de experimentos NOE en este derivado se observó un efecto NOE de un 3.6% entre los protones 3-H y 4-H y no se detectó NOE entre el protón

4-H y el grupo metilo en posición 3 (Esquema 2.24). Los resultados obtenidos mediante los experimentos NOE y el valor de la constante de acoplamiento indican que los protones 3-H y 4-H se orientan hacia la misma cara del anillo de azetidinona, y que por tanto la β -lactama obtenida es *cis*.

Hay que destacar que la diferencia de energía de los estados de transición (6 KJ/mol) calculada en los estudios teóricos es suficiente para que no se observe la formación de la β -lactama *trans*-3*S*,4*R*.

Para poder asignar la configuración absoluta C-3,4 del derivado β -lactámico **2.97** se llevó a cabo la preparación de los dipéptidos derivados de L-Phe y D-Phe. Para ello se hidrolizó el éster *tert*-butílico en medio ácido y a continuación se prepararon los dipéptidos (*S,S,S*)**2.99** y (*S,S,R*)**2.99**, por reacción de la correspondiente 4-carboxi-2-azetidinona con H-L-Phe-OMe y H-D-Phe-OMe, respectivamente, empleando BOP/TEA (Esquema 2.26). Cada uno de estos dipéptidos se obtuvo con buen rendimiento como un único diastereoisómero.



Esquema 2.26

Tabla 2.6. Desplazamientos químicos y tiempos de retención de los derivados dipeptídicos.

Compuesto	Rdto (%) ²	δ 4-H (ppm)	δ 3-CH ₃ (ppm)	t_R HPLC (min)
(<i>S,S,S</i>) 2.99	71	3.86	0.92	24.24
(<i>S,S,R</i>) 2.99	68	3.74	1.08	25.97

^a Rendimiento del producto aislado

En la Tabla 2.6, están recogidos los desplazamientos químicos de los protones 4-H, del grupo metilo 3-CH₃ y los tiempos de retención de los dipéptidos (*S,S,S*)**2.99** y (*S,S,R*)**2.99**. En estos compuestos, a diferencia de los anteriores derivados, no hay protones β -H del residuo alifático y las diferencias en el desplazamiento químico en los protones 4-H no son muy significativas. Sin embargo, el grupo metilo (3-CH₃) aparece 0.23 ppm más apantallado en el derivado (*S,S,S*)**2.99**, por lo que por analogía con los derivados anteriores se asignó como el dipéptido homoquiral. Además, el compuesto (*S,S,R*)**2.99** presenta un tiempo de retención mayor y por tanto se asignó como el dipéptido heteroquiral. Con estos datos, y teniendo en cuenta la configuración del residuo de Phe que se ha acoplado, se puede concluir que la β -lactama **2.97** precursora posee configuración 3*S*,4*S*.

En conclusión, el procedimiento descrito para la preparación enantioselectiva de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas a partir de aminoácidos es también de aplicación a la síntesis de análogos 1,3,4-trisustituidos en forma ópticamente pura a partir de derivados de Gly

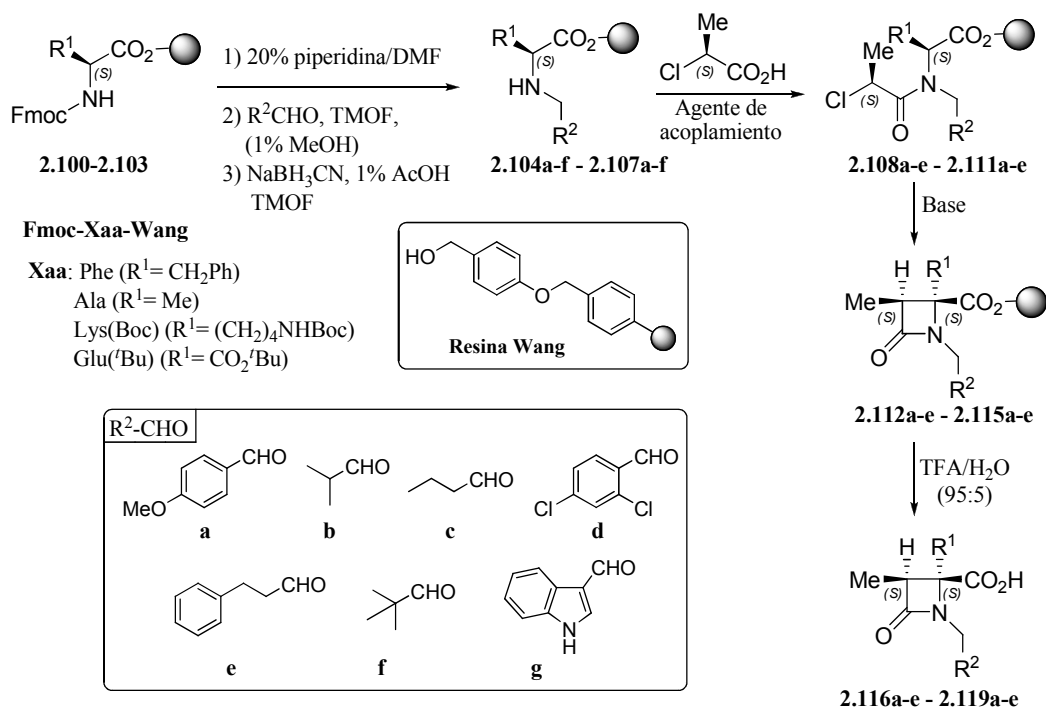
2.4.2. Síntesis en fase sólida de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas

Teniendo en cuenta la escasez de métodos disponibles para la obtención de β -lactamas diferentemente sustituidas en fase sólida, se consideró de interés estudiar la posibilidad de adaptar el protocolo previamente descrito para la obtención en disolución de 2-azetidinonas 1,3,4,4-tetrasustituidas a la química en fase sólida. Por ello, se planteó desarrollar un procedimiento que permitiera la generación de una pequeña quimioteca de compuestos, basada en éste esqueleto privilegiado, con dos puntos de diversidad estructural que pueden variarse mediante una adecuada combinación de aldehídos y aminoácidos de partida.

Para llevar a cabo la preparación de los derivados β -lactámicos objetivo se siguió una estrategia sintética paralela a la desarrollada en nuestro grupo de investigación para la obtención en fase sólida de β -lactamas 1,4,4-trisustituidas, anteriormente comentada en la introducción¹¹⁸.

Como matriz polimérica se empleó una resina de poliestireno tipo Wang, con los aminoácidos seleccionados anclados a través del grupo carboxilato. Se eligieron Phe, Ala, Lys(Boc) y Glu(^tBu), como representantes de aminoácidos aromático, alifático, básico y ácido, respectivamente. Se seleccionaron inicialmente siete aldehídos, tanto de naturaleza aromática como alifática.

Como se muestra en el Esquema 2.27, el primer paso de la secuencia sintética es la etapa de aminación reductora. Así tras la eliminación en medio básico del grupo protector Fmoc se llevó a cabo la reacción con los aldehídos seleccionados utilizando TMOF (ortoformiato de trimetilo) como disolvente. Cabe destacar que en el caso de las reacciones con los aldehídos alifáticos **b**, **c** y **f** fue necesaria la adición de 1% de MeOH para la completa formación de la imina correspondiente¹²⁴. Desafortunadamente, la solubilidad del 1-indolilcarboxaldehído (**g**) en TMOF resultó ser muy baja por lo que se decidió prescindir de este aldehído. La reducción de la iminas con NaBH₃CN en presencia de ácido acético condujo a las resinas **2.104a-f-2.107a-f**. La finalización de la reacción se controló mediante el test de Kaiser de aminas primarias.



$R^1 \backslash R^2$					
	2.104a 2.108a 2.112a 2.116a	2.104b 2.108b 2.112b 2.116b	2.104c 2.108c 2.112c 2.116c	2.104d 2.108d 2.112d 2.116d	2.104e 2.108e 2.112e 2.116e
	2.105a 2.109a 2.113a 2.117a	2.105b 2.109b 2.113b 2.117b	2.105c 2.109c 2.113c 2.117c	2.105d 2.109d 2.113d 2.117d	2.105e 2.109e 2.113e 2.117e
	2.106a 2.110a 2.114a	2.106b 2.110b 2.114b	2.106c 2.110c 2.114c	2.106d 2.110d 2.114d	2.106e 2.110e 2.114e
	2.118a	2.118b	2.118c	2.118d	2.118e
	2.107a 2.111a 2.115a	2.107b 2.111b 2.115b	2.107c 2.111c 2.115c	2.107d 2.111d 2.115d	2.107e 2.111e 2.115e
	2.119a	2.119b	2.119c	2.119d	2.119e

Esquema 2.27

El siguiente paso en la secuencia sintética consistió en la incorporación del grupo 2-cloropropionilo. Se decidió poner a punto esta reacción con el derivado de Phe **2.104d** (0.2 mmol) utilizando en primer lugar las mismas condiciones empleadas en disolución (método A): ácido 2-(*S*)-cloropropiónico (1 mmol), PyBroP (1 mmol) como agente de acoplamiento y DIEA (0.9 mmol). Trascurridas 5h de reacción, el test de cloranilo de aminas secundarias resultó positivo. Se tomó una alícuota de resina, que se sometió a las condiciones de desanclaje en medio ácido y el crudo de reacción fue analizado mediante HPLC-MS. Como se observa en el cromatograma 1 (Figura 2.12), tras la reacción de acoplamiento, queda aún mucho producto de partida sin reaccionar. Se decidió repetir la reacción en las mismas condiciones pero, como muestra el cromatograma 2, esto no supuso un aumento significativo del *N*-cloropropionil derivado. Por tanto, podemos concluir que las condiciones de acoplamiento empleadas en la síntesis en disolución no son las más adecuadas para la síntesis en fase sólida.

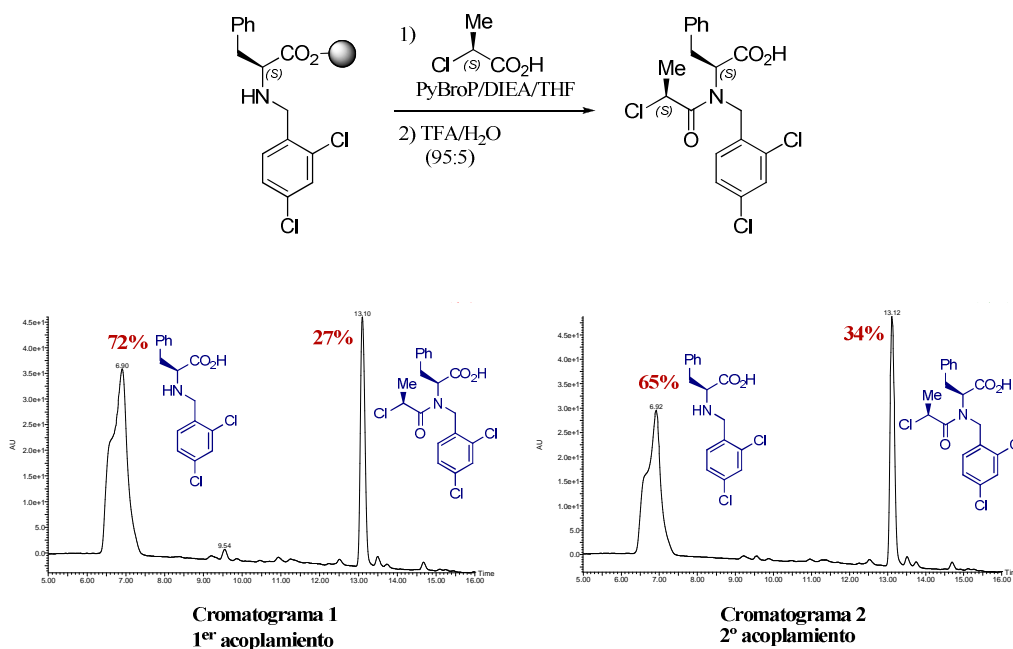


Figura 2.12. Cromatogramas de HPLC-MS obtenidos mediante el método A

Como se comentó en la introducción, en el trabajo previo de nuestro grupo de investigación para la síntesis en fase sólida de β -lactamas 1,4,4-trisustituidas, la reacción con cloruro de cloacetilo condujo satisfactoriamente a la formación del correspondiente *N*-cloroacetil derivado. Teniendo en cuenta este precedente, se procedió a llevar a cabo la reacción entre la resina **2.104d** (0.2 mmol) y el cloruro de cloropropionilo racémico (1 mmol) en presencia de óxido de propileno (3 mmol) (método B). Como se observa en los cromatogramas de la Figura 2.13, repitiendo la reacción dos veces, se consumió todo el producto de partida y se formaron los dos diastereoisómeros esperados, aunque con cierta resolución cinética. Este resultado pone de manifiesto que la reacción de acilación transcurre satisfactoriamente con cloruros de ácido. Por tanto era necesario conseguir un método para poder generar *in situ* el cloruro de ácido correspondiente al ácido 2-(*S*)-cloropropiónico.

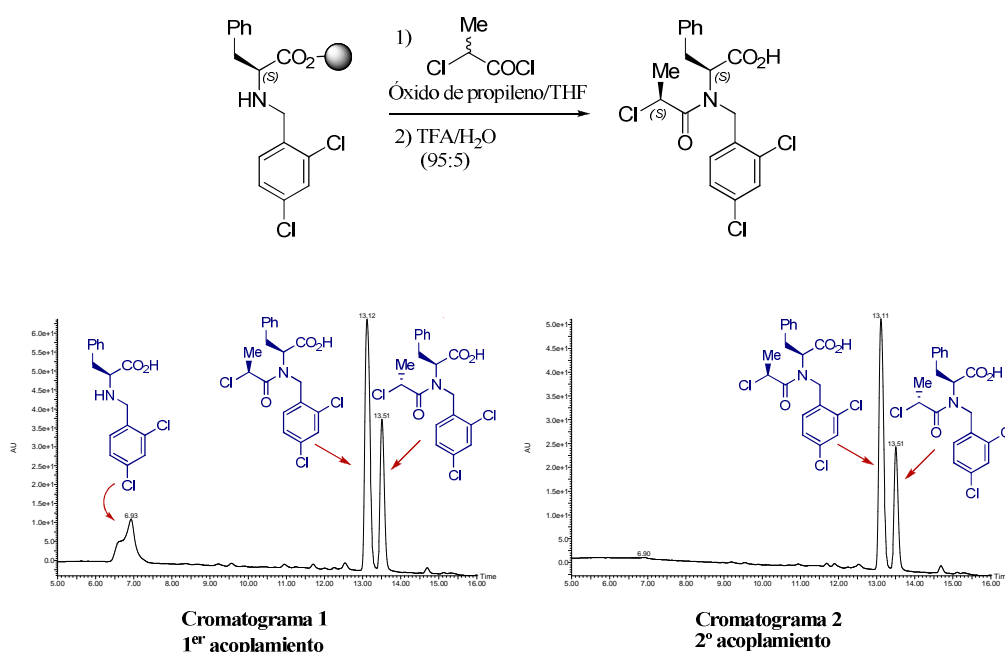


Figura 2.13. Cromatogramas de HPLC-MS obtenidos mediante el método B

Se encontró en la bibliografía un método sencillo que refería la generación de cloruros de ácido a partir de ácidos carboxílicos, empleando tricloroacetronitrilo, como

agente clorante, trifenilfosfina y DIEA como base^{122,123}. De este modo, el cloruro de ácido generado *in situ* del ácido 2(*S*)-cloropropiónico (1 mmol), por reacción con tricloroacetnitrilo (2.25 mmol) y trifenilfosfina (2.4 mmol), reacciona con la resina **2.104d** (0.2 mmol), en presencia de DIEA (2.25 mmol) (método C). Siguiendo este procedimiento, como se muestra en los cromatogramas de la Figura 2.14, la conversión obtenida resultó ser muy alta, aunque acompañada de epimerización elevada del producto final, probablemente debido a la racemización del cloruro de 2-(*S*)-cloropropionilo en el medio básico (DIEA) en el que transcurre la reacción.

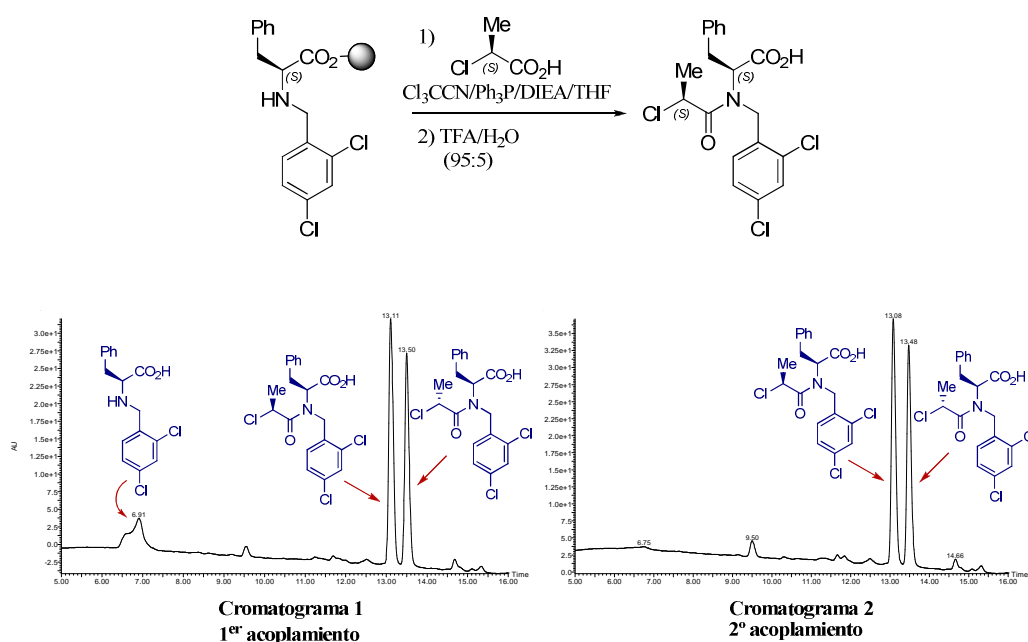


Figura 2.14. Cromatogramas de HPLC-MS obtenidos mediante el método C

En base a los estudios anteriores, se decidió llevar a cabo esta reacción en condiciones neutras, utilizando óxido de propileno en lugar de DIEA como captador de hidrácidos (método D). De este modo la ausencia de base a lo largo del proceso debería garantizar la preservación del centro esterogénico del ácido 2-(*S*)-cloropropiónico de partida. Como se observa en los cromatogramas de la Figura 2.15, los resultados obtenidos con este último método fueron los mejores, teniendo en cuenta tanto la

conversión como la diastereoselectividad del producto final, ya que la epimerización observada fue tan solo de un 6%.

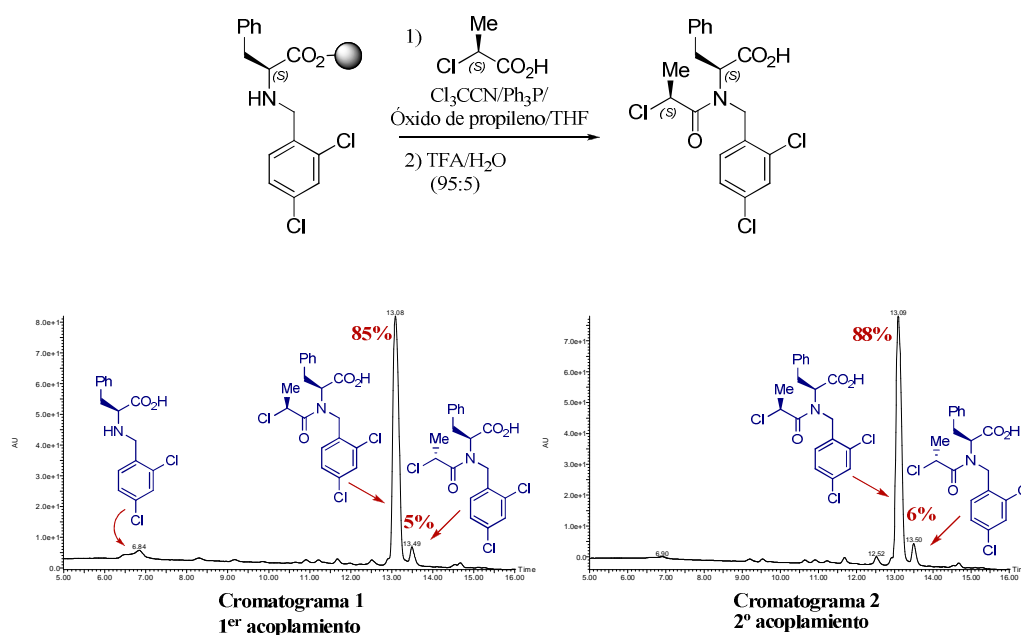


Figura 2.15 Cromatogramas de HPLC-MS obtenidos mediante el método D

Los restantes *N*-2-cloropropionil derivados **2.108a-e-2.111a-e** se obtuvieron bajo estas últimas condiciones. Desafortunadamente esta reacción no transcurrió satisfactoriamente en el caso de las resinas **2.104-2.107f**, portadoras de un grupo *tert*-butilamino. Posiblemente, la causa por la que la reacción de acilación no se haya completado en estos casos sea el elevado impedimento estérico en torno al grupo *tert*-butilamino.

La finalización de todas estas reacciones de acilación se controló mediante el test del cloranilo de aminas secundarias.

A modo de resumen en la Tabla 2.7 se recogen las diferentes condiciones de los métodos de acilación empleados, así como los valores de conversión y exceso diastereoisomérico obtenidos en cada caso.

Tabla 2.7. Condiciones de reacción, conversión y exceso diastereoisomérico observado en los métodos de acilación empleados.

Método	Agente acilante	Condiciones de reacción	Conversión (%) ^a		Proporción de diastereoisómeros (2ª reacción) ^a
			1ª reacción	2ª reacción	
A		PyBroP/DIEA/THF	27	34	97:3
B		Óxido de propileno/THF	76	99	70:30
C		Cl ₃ CCN/Ph ₃ P/DIEA/THF	74	99	53:47
D		Cl ₃ CCN/Ph ₃ P/Óxido de propileno/THF	90	94	94:6

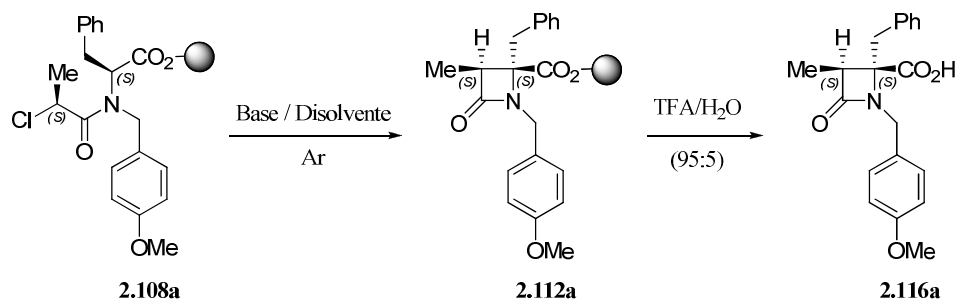
^aDeterminada por HPLC-MS.

Una vez preparados los *N*-2-cloropropionil derivados **2.108a-e-2.111a-e**, el siguiente paso en la secuencia sintética fué la ciclación intramolecular en medio básico. Se decidió emplear en primer lugar las condiciones descritas en la síntesis de las β -lactamas 1,4,4-trisustituidas, utilizando BEMP como base y DCM como disolvente. Desafortunadamente, cuando se llevó a cabo la reacción con el derivado de Phe **2.108a** en esas condiciones no se observó la formación del derivado β -lactámico correspondiente (Esquema 2.28). Por tanto, fue necesario buscar otras condiciones para la ciclación intramolecular de los *N*-2-cloropropionil derivados.

Los ensayos llevados a cabo para estudiar la reacción de ciclación se realizaron empleando bases orgánicas fuertes en disolventes o mezclas de disolvente de diferente polaridad. En todos los casos se emplearon 5 equivalentes de base y se dejó transcurrir la reacción durante 15h. Pasado este tiempo se repitió la reacción en idénticas condiciones. Finalmente, tras los correspondientes lavados, se tomaron alícuotas de cada una de las resinas, que se sometieron a las condiciones de desanclaje en medio ácido y los crudos de reacción fueron analizados mediante HPLC-MS.

Como se observa en la Tabla 2.8, los mejores resultados se consiguieron con las bases de tipo fosfazeno más fuertes (BTPP o BEMP) en el disolvente de mayor polaridad ensayado, DMF. Por tanto bajo estas condiciones se obtuvieron los derivados β -lactámicos anclados a resina **2.112a-e-2.115a-e**. Finalmente se llevó a cabo la etapa final

de desanclaje en medio ácido, empleando TFA:H₂O (95:5), tras la cual se obtuvieron las β -lactamas objetivo **2.116a-e-2.119a-e**.



Esquema 2.28

Tabla 2.8. Bases y disolventes empleados en la ciclación de **2.108a**.

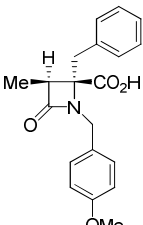
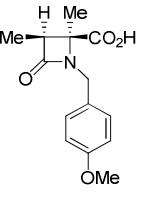
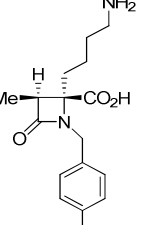
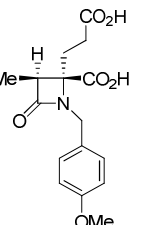
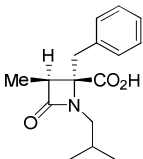
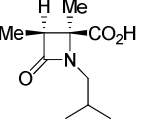
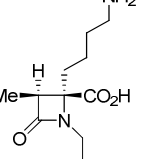
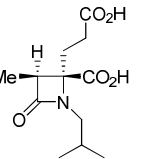
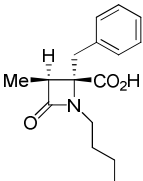
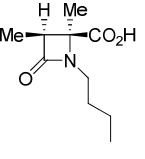
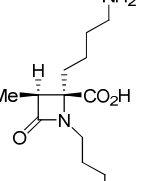
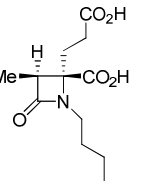
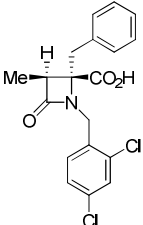
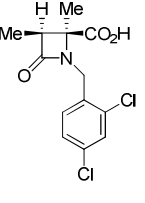
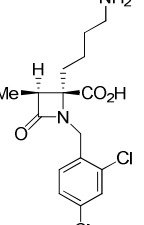
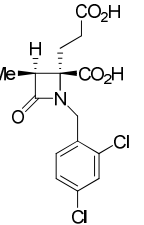
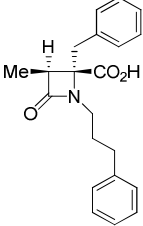
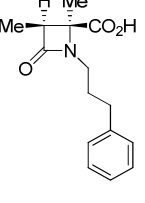
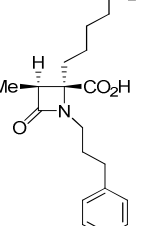
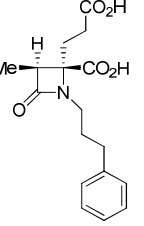
Base	pK _a (MeCN)	Disolvente	Conversión (%) ^a
 BEMP	27.6	DCM:THF (1:1)	15
		NMP	69
		DMF	88
 MTDB	25.5	DCM:THF (1:1)	< 10
 P₁-^tBu	26.7	DCM:THF (1:1)	<10
 BTPP	28.4	DCM:THF (1:1)	49
		DMF	90

^a Determinada por HPLC

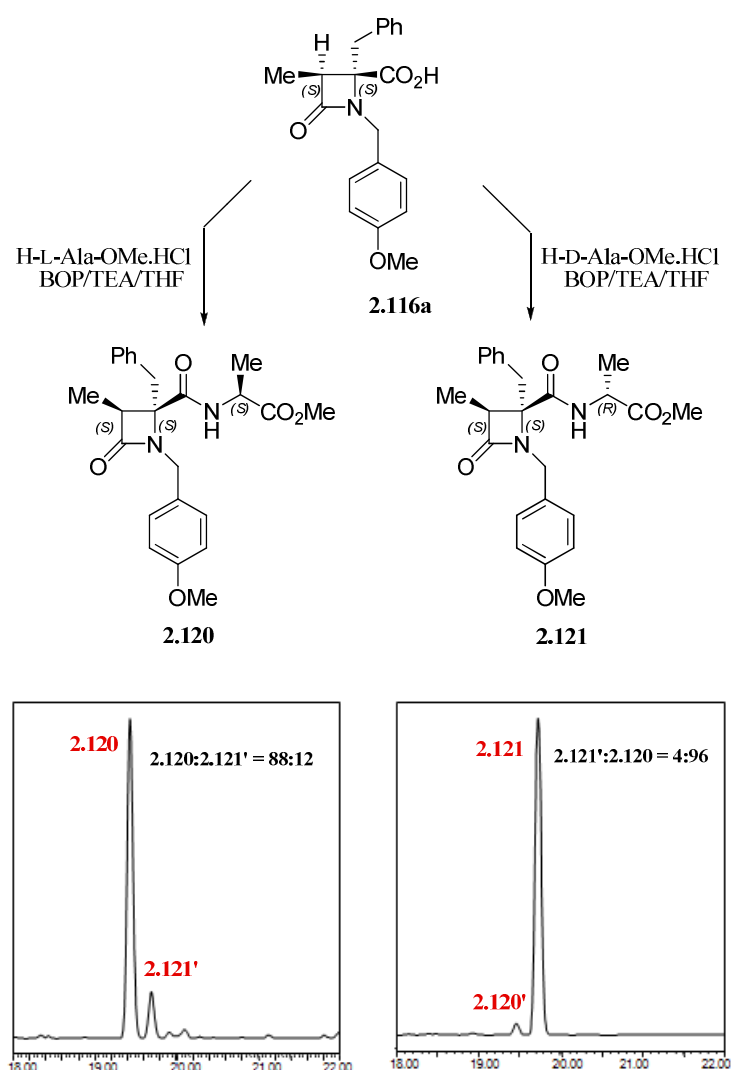
Los crudos de reacción obtenidos fueron purificados empleando cartuchos de extracción en fase sólida. Concretamente, en el caso de los derivados de Phe, Ala y Glu se emplearon cartuchos de fase normal, con relleno de sílice, mientras que los derivados de Lys se purificaron a través de cartuchos de fase reversa, con relleno C-18. Tras esta etapa

de purificación, los derivados fueron aislados con rendimientos globales comprendidos entre 11 y 61% y purezas superiores al 90% en la mayoría de los casos (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Rendimiento y pureza obtenidos para los componentes de la quimioteca tras la etapa de purificación

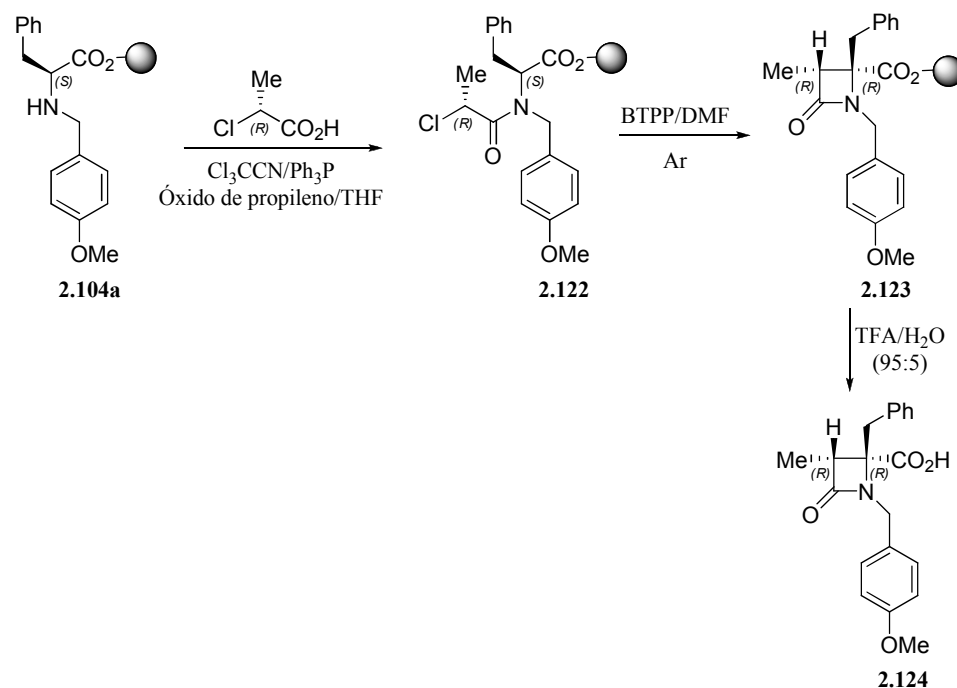
Derivados Phe Rdto (pureza)	Derivados Ala Rdto (pureza)	Derivados Lys Rdto (pureza)	Derivados Glu Rdto (pureza)
 <p>2.116a 12 (41)</p>	 <p>2.117a 14 (92)</p>	 <p>2.118a 24 (98)</p>	 <p>2.119a 12 (69)</p>
 <p>2.116b 61 (93)</p>	 <p>2.117b 47 (98)</p>	 <p>2.118b 33 (95)</p>	 <p>2.119b 24 (98)</p>
 <p>2.116c 49 (86)</p>	 <p>2.117c 26 (97)</p>	 <p>2.118c 34 (93)</p>	 <p>2.119c 24 (45)</p>
 <p>2.116d 45 (94)</p>	 <p>2.117d 47 (98)</p>	 <p>2.118d 23 (96)</p>	 <p>2.119d 40 (83)</p>
 <p>2.116e 37 (94)</p>	 <p>2.117e 29 (93)</p>	 <p>2.118e 41 (98)</p>	 <p>2.119e 11 (82)</p>

La configuración absoluta en los carbonos C-3,4 de las β -lactamas obtenidas se asignó indirectamente a través de la síntesis de los derivados dipeptídicos **2.120** y **2.121**, a partir de **2.116a**, por comparación con los dipéptidos de Phe **2.89a** y **2.89d** preparados a partir de la misma β -lactama previamente obtenida en disolución (Esquema 2.29). Así, el dipéptido **2.120** era idéntico al compuesto **2.89a** cuya configuración había sido establecida como (3*S*,4*S*,1'*S*). Por otra parte, todos los datos analíticos y espectroscópicos de **2.121** eran idénticos a los de su enantiómero **2.89d** (3*R*,4*R*,1'*S*).



Esquema 2.29

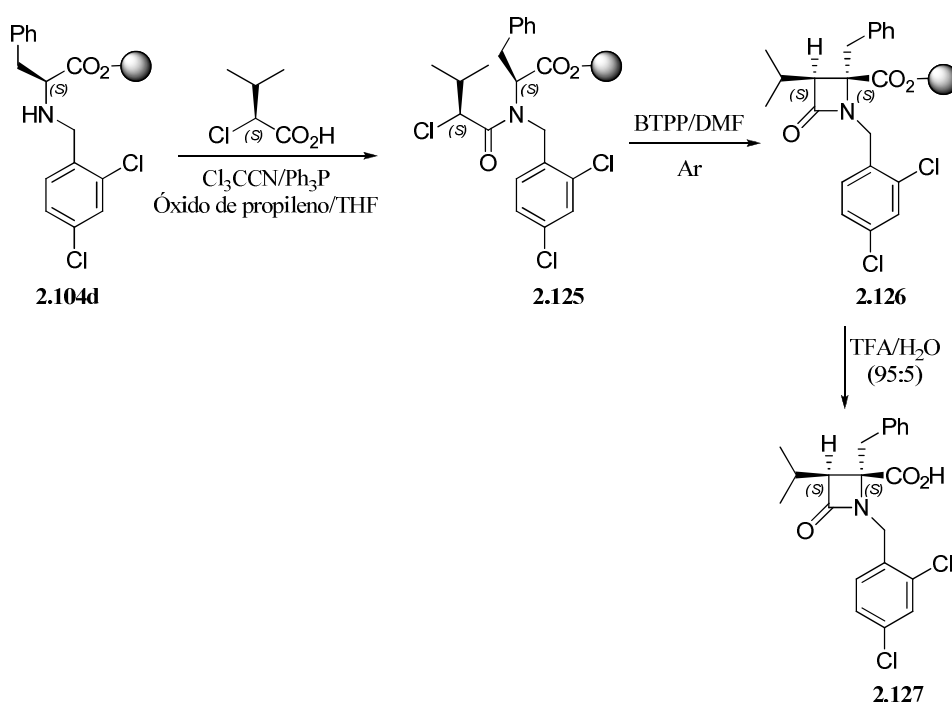
Aunque en los cromatogramas mostrados en el Esquema 2.29 se observa cierta resolución cinética, los dipéptidos se obtuvieron con una relación diastereoisomérica promedio 92:8, muy similar a la observada en los *N*-cloropropionil derivados de partida (94:6). Este hecho pone de manifiesto el elevado control estereoquímico con el que se obtienen las β -lactamas a través de este procedimiento en fase sólida. Para corroborar este punto, se decidió sintetizar la β -lactama **2.124**, de configuración *3R,4R*. Así, la acilación de la resina **2.104a** con el ácido 2-(*R*)-cloropropiónico, seguida de ciclación intramolecular en medio básico y posterior desanclaje con TFA, proporcionó el derivado deseado **2.124**, enantiómero de **2.116a**, con buen rendimiento y pureza (Rdto: 24%; Pureza: 95%) (Esquema 2.30).



Esquema 2.30

En base a estos resultados podemos concluir que, al igual que con el procedimiento desarrollado en disolución, esta metodología en fase sólida permite elegir la configuración absoluta de la β -lactama, (*3S,4S*) o (*3R,4R*), simplemente teniendo en cuenta la configuración *S* o *R* del ácido 2-cloropropiónico empleado en la etapa de acilación.

Con objeto de estudiar con más profundidad esta estrategia sintética, se planteó la posibilidad de preparar β -lactamas con sustituyentes diferentes al metilo en posición 3, introduciendo de este modo un nuevo punto de diversidad estructural en estos derivados. Así, partiendo de la resina **2.104d**, se llevó a cabo la acilación con el ácido 2-(*S*)-cloroisobutírico, que tras la ciclación en medio básico y el desanclaje con TFA, dio lugar a la 3-isopropil azetidinona **2.127**, con rendimiento y pureza excelentes (Rdto: 80%; Pureza: 98%) (Esquema 2.31).



Esquema 2.31

Es importante destacar que el soporte polimérico juega un papel muy importante en el éxito de esta secuencia sintética. En el protocolo desarrollado, y comentado anteriormente, se eligieron aminoácidos anclados a una resina Wang, cuyo espaciador se muestra en la Figura 2.16. Se intentó también aplicar esta metodología a aminoácidos anclados a resinas MPPA-Wang y Rink amida, resultando ambos intentos infructuosos.

En primer lugar, en el ensayo realizado con la resina MPPA-Wang, las β -lactamas se desanclaron del soporte polimérico durante la etapa de ciclación en medio

básico, resultando muy complicada su purificación posterior, ya que había que separar la β -lactama formada del exceso de base presente en los filtrados. Este desanclaje indeseado podría deberse a una mayor sensibilidad de esta resina al medio fuertemente básico de la etapa de ciclación.

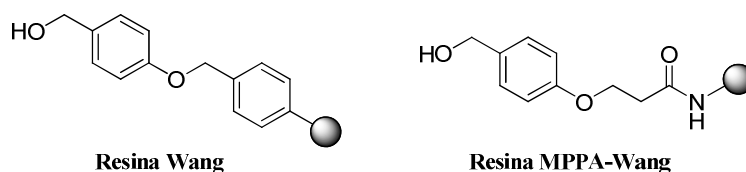
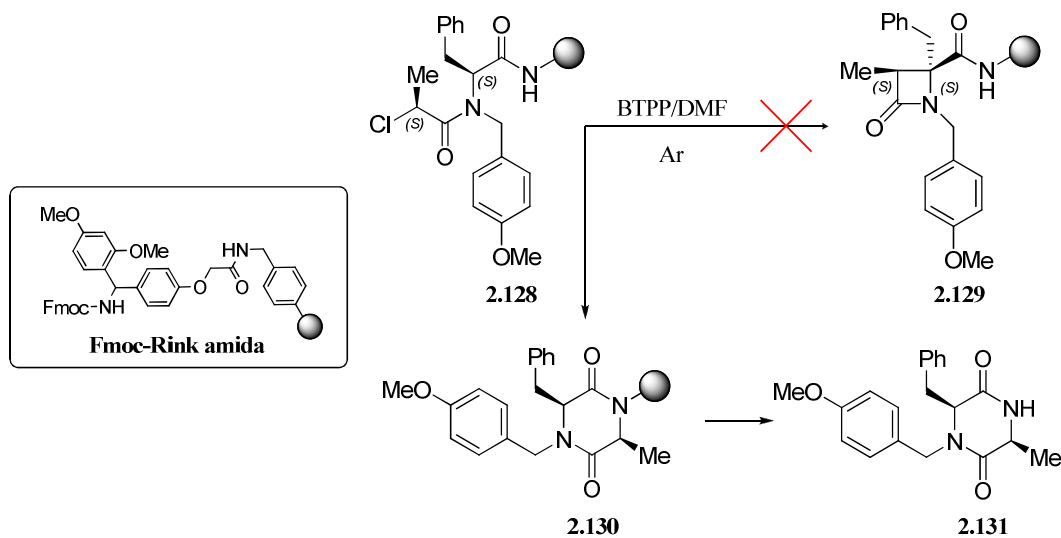
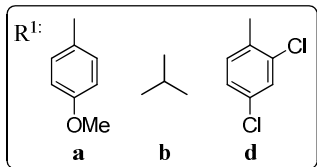


Figura 2.16. Espaciadores de las resinas Wang y MPPA-Wang

En segundo lugar, cuando se empleó la resina Rink-Amida tampoco se detectó la presencia de β -lactama tras el desanclaje final, ya que tan solo se observó la formación de la correspondiente 2,5-dicetopiperazina **2.131** (Esquema 2.32). Esto indica que, a pesar del impedimento estérico debido a la resina, la ciclación al anillo de seis miembros es mucho más rápida que la formación del anillo β -lactámico. La formación de este tipo de dicetopiperazinas fue observada con anterioridad en la ciclación intramolecular en disolución de 2-cloroacetil derivados de dipéptidos¹¹¹.



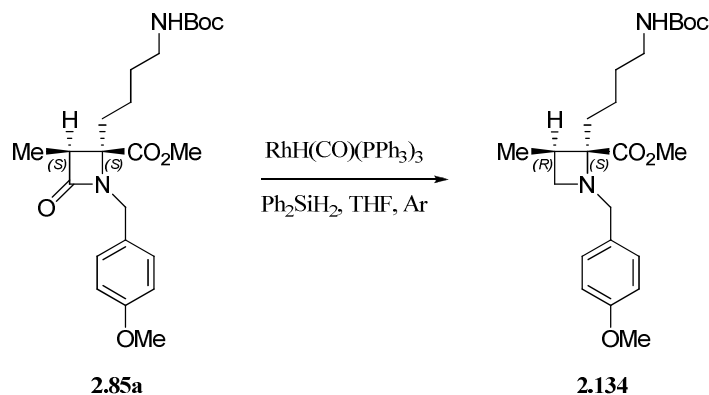
Esquema 2.32



Resina de partida	Nº reacción	Proporción azetidina:β-lactama
2.112a	1	50:50
	2	58:42
	3	59:41
2.112b	1	13:87
	2	35:65
	3	54:46
2.112d	1	12:88
	2	30:70
	3	49:51

Se intentó optimizar este proceso realizando nuevos ensayos en los que se cambió Ph_2SiH_2 por PhSiH_3 , se aumentó la cantidad de catalizador y se sustituyó el THF por DCM. Sin embargo, todos los intentos resultaron infructuosos y no mejoraron los resultados previamente obtenidos. De cualquier modo, los crudos de reacción se purificaron cuidadosamente con cartuchos de extracción de gel de sílice y finalmente se lograron aislar, aunque con muy bajos rendimientos, las azetidinas **2.133 a,b,d**.

Puesto que este método de reducción quimioselectiva de β -lactamas a azetidinas se había realizado con éxito en disolución para el caso de β -lactamas 1,4,4-trisustituídas, nos planteamos hacer un ensayo en disolución con una de las β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituídas preparadas en el apartado 2.4.1.1. Se pretendía estudiar si la presencia de un sustituyente adicional en posición 3 (Me), pudiera influir en el transcurso de la reacción y justificase de este modo los bajos rendimientos obtenidos en fase sólida. Así, se eligió la β -lactama derivada de Lys, **2.85a**, y se llevó a cabo la reacción de reducción en las condiciones descritas, obteniéndose la correspondiente azetidina **2.134**, con buen rendimiento (84%) (Esquema 2.34).



Esquema 2.34

Este resultado pone de manifiesto que la presencia del sustituyente metilo en posición 3 en el anillo de azetidina no dificulta la reacción de reducción en disolución, pudiéndose obtener la correspondiente azetidina satisfactoriamente. Los bajos rendimientos obtenidos en fase sólida no pueden ser achacados, por tanto, a la diferente sustitución de las β -lactamas de partida, sino que probablemente sean debidos a que este

protocolo no se ha adecuado correctamente a la metodología de síntesis en fase sólida, siendo necesarias futuras optimizaciones.

Como resumen de este apartado, podemos decir que se ha conseguido implementar con éxito la metodología desarrollada en disolución para la síntesis de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas a partir de aminoácidos a la síntesis en fase sólida. Empleando este protocolo se ha generado una pequeña quimioteca de 20 β -lactamas con cierta diversidad estructural, obteniéndose los productos finales con rendimientos satisfactorios y elevada pureza. Se ha explorado también la introducción de diferentes sustituyentes en posición 3 del anillo β -lactámico. Finalmente, se ha estudiado la reducción quimioselectiva de β -lactamas a azetidinas en fase sólida aunque esta reacción no se ha conseguido optimizar adecuadamente, por el momento.

2.4.3. Evaluación biológica

Una vez sintetizada la quimioteca de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas, y teniendo en cuenta que el anillo β -lactámico puede considerarse un esqueleto privilegiado en química médica¹²⁶, se pensó que sería interesante enviar estos compuestos a nuestros grupos colaboradores que poseen laboratorios con sistemas de evaluación de alto rendimiento. De esta forma, los productos descritos en el apartado 2.4.2 fueron evaluados frente a diferentes virus como agentes antivirales, moduladores de canales iónicos TRPV1 y TRPM8 y como agentes antitumorales frente a tres líneas celulares tumorales, como se describe con más detalle a continuación.

2.4.3.1. Evaluación biológica como agentes antivirales

Los productos finales descritos en el apartado 2.4.2 (**2.116-2.119a-e**, **2.124**, **2.127** y **2.133abd**) fueron enviados al Instituto Rega (Universidad de Lovaina) para ser evaluados como potenciales agentes antivirales por el equipo del Dr. Jan Balzarini. Los compuestos se evaluaron en un amplio panel de virus que incluyeron: citomegalovirus humano (CMVH), varicela zoster, estomatitis vesicular, coxsackie B4, sincitial, influenza, reovirus-1, sindbis, punta toro, herpes 1 y 2 y coronavirus felino. Desafortunadamente, todos los compuestos resultaron ser inactivos frente a los virus ensayados, con la excepción de los derivados **2.127** y **2.133d** que inhibieron moderadamente la replicación del CMVH (Figura 2.17). Este resultado pone de manifiesto nuevamente el interés de las azetidinas y β -lactamas en la búsqueda de agentes anti-CMVH, como ya quedó patente en el Capítulo 1.

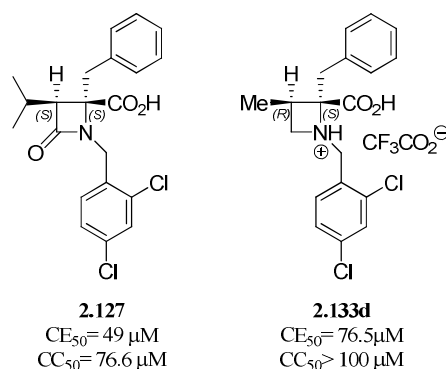


Figura 2.17. Derivados con mejor actividad antiviral frente a CMVH

2.4.3.2. Evaluación biológica como moduladores de canales iónicos

La evaluación de la actividad de los derivados del apartado 2.4.2 (**2.116-2.119a-e**, **2.124**, **2.127** y **2.133abd**) como moduladores de los canales iónicos de los receptores TRPV1 y TRPM8 se llevó a cabo por el equipo del Dr. Ferrer Montiel en la Universidad Miguel Hernández. Estos canales iónicos pertenecen a la familia de receptores TRP (*receptores de potencial transitorio*). El receptor TRPV1 (*receptor de potencial transitorio subfamilia vainilloide tipo 1*) es un canal ionotrópico no selectivo, aunque presenta cierta preferencia por el catión Ca^{2+} , que se activa por capsaicina y por el cannabinoide endógeno anandamida así como por ciertos estímulos nocivos, como el calor ($> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$) y el pH (< 6)^{127,128}. El receptor TRPM8 (*receptor de potencial transitorio subfamilia melastatina tipo 8*) se activa por mentol y bajas temperaturas ($< 23\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$)¹²⁸. Estos canales iónicos desempeñan un papel importante en la percepción del dolor y en la inflamación neurogénica¹²⁸. Además, existen evidencias experimentales que implican a estos receptores en el desarrollo de ciertas enfermedades neurodegenerativas y en el cáncer^{129,130}. Por lo tanto, los receptores TRPV1 y TRPM8 se han convertido en dianas biológicas de gran atractivo para el descubrimiento de nuevos fármacos, principalmente nuevos agentes analgésicos para el tratamiento del dolor neuropático^{127,130}.

En general todos los compuestos mostraron actividades no significativas en los ensayos realizados, observándose tan solo una capacidad bloqueante muy moderada de los compuestos **2.116c** y **2.117e** sobre el receptor TRPM8 (Figura 2.18).

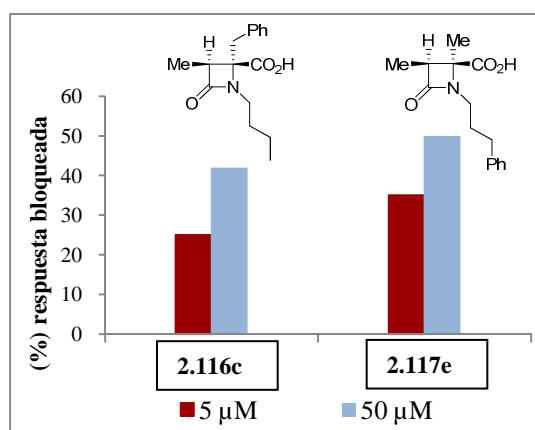


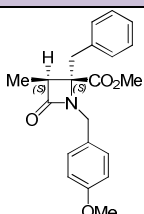
Figura 2.18. Derivados con mejor capacidad bloqueante en el canal TRPM8

Estos compuestos constituyen el primer ejemplo de moduladores de TRPM8 con estructura β -lactámica. No se descarta que puedan ser funcionalizados en el futuro para intentar obtener bloqueadores de TRPM8 más potentes.

2.4.3.3. Evaluación biológica como agentes antitumorales

Como se indicó en la introducción, existen diferentes familias de compuestos β -lactámicos que poseen actividades antitumorales interesantes²²⁻³⁰. Por otra parte, nuestra colaboración con la empresa farmacéutica PharmaMar, EPO de nuestros proyectos, nos facilitaba disponer de una batería de ensayos celulares para evaluar posibles actividades antitumorales. Por ello, los compuestos de nuestra quimioteca de β -lactamas **2.116a-e**, **2.119a-e**, **2.124**, **2.127** y las correspondientes azetidinas **2.133abd** fueron enviados a dicha compañía para su evaluación *in vitro* como agentes antitumorales en tres líneas celulares cancerosas, mama (MDA-MB-231), pulmón (A549) y colon (HT29), empleando doxorrubicina como control. En este ensayo se incluyeron también los derivados β -lactámicos descritos en el apartado 2.4.1.1 (**2.77a**, **2.77d**, **2.84a-2.86a**, **2.84d-2.86d** y **2.88**). Aunque casi todos los compuestos resultaron inactivos, el derivado **2.77a** fue capaz de inhibir significativamente la proliferación celular en las tres líneas tumorales ensayadas a concentraciones micromolares (Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Inhibición de la proliferación celular (GI_{50} , μM)^a en cultivos de células tumorales por el compuesto **2.77a**.

Compuesto	Mama MDA-MB-231	Pulmón A549	Colon HT29
 <p>2.77a</p>	7.07	5.38	1.58
Doxorrubicina	0.49	0.66	1.13

^a GI_{50} : Concentración requerida para inhibir la proliferación celular en un 50%.

A partir de los datos biológicos obtenidos para esta familia de derivados se pudieron establecer algunas conclusiones, aunque muy preliminares, respecto a las

relaciones entre estructura y actividad de estos compuestos. En primer lugar, parece ser necesaria la presencia de un grupo aromático en posición 4 del anillo de azetidinona, ya que solamente el derivado de Phe **2.77a** mostró actividad, mientras que las β -lactamas análogas derivadas de Ala (**2.84a**), Lys (**2.85a**) y Glu (**2.86a**), resultaron inactivas. Por otra parte, se observa preferencia por la configuración (*S,S*) ya que el enantiómero de **2.77a** de configuración (*R,R*) (**2.77d**) también resultó inactivo. Por último, de todos los sustituyentes en el nitrógeno de anillo β -lactámico, solamente el grupo *p*-metoxibencilo condujo a un compuesto activo.

2.4.3.4. Intentos de optimización de la actividad antitumoral de **2.77a**

En base a los resultados del compuesto **2.77a**, se planteó realizar una serie de modificaciones estructurales sobre éste, con el objetivo de intentar encontrar nuevos derivados con mayor potencia citotóxica. Se decidió preparar análogos mediante introducción de diversidad estructural en tres puntos del modelo de partida, **2.77a** (Figura 2.19). En primer lugar se llevaron a cabo modificaciones sobre el sustituyente en posición 1 del anillo de azetidinona, en las que se reemplazó el *p*-metoxibencilo por otras agrupaciones bencílicas con diferentes sustituyentes en posición *para*, así como por otros grupos de naturaleza aromática. En segundo lugar, se sustituyó el éster metílico en posición 4 del anillo de azetidinona por diferentes amidas sustituidas, tanto con grupos alifáticos, como aromáticos y polares. Por último, se modificó el grupo bencilo en posición 4, proveniente de la cadena lateral de Phe, por otros grupos aromáticos, preparando las correspondientes β -lactamas derivadas de aminoácidos de naturaleza aromática (Trp o Tyr).

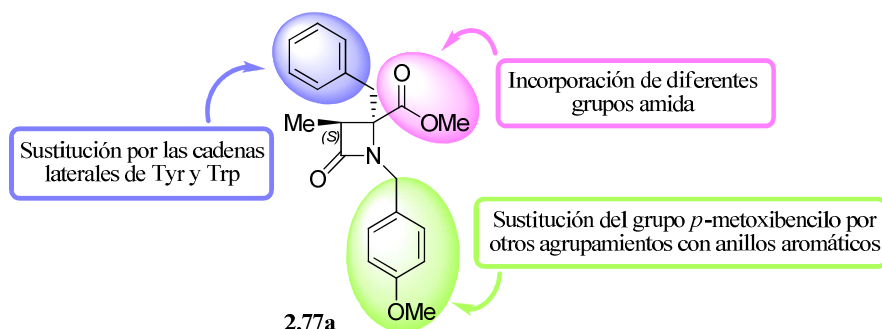
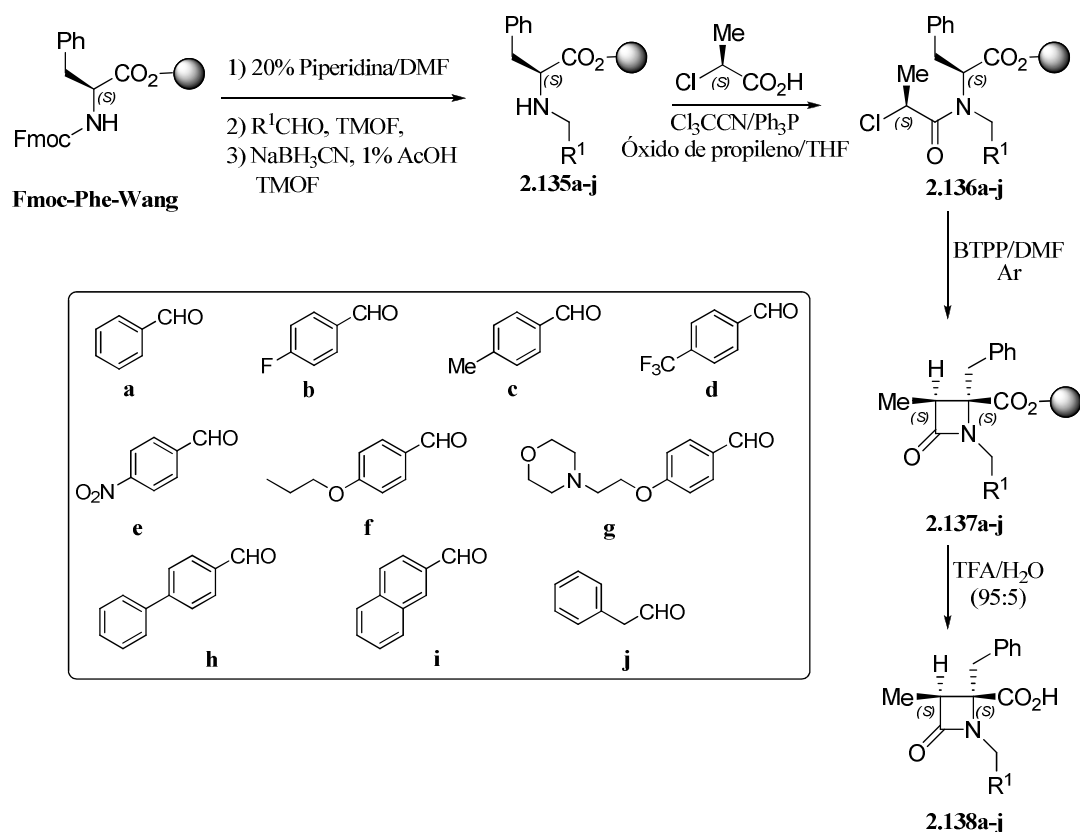


Figura 2.19. Modificaciones estructurales propuestas a partir de **2.77a**

a) Modificaciones en el grupo 1-*p*-metoxibencilo

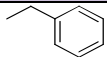
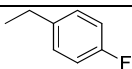
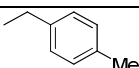
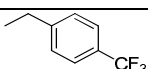
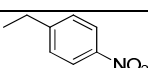
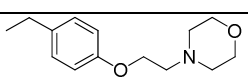
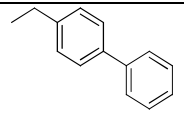
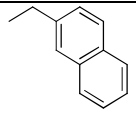
En el primer grupo de análogos estructurales del compuesto **2.77a** se contempla la sustitución del grupo *p*-metoxibencilo, presente en posición 1 del anillo de azetidiona, por otros agrupamientos portadores de anillos aromáticos. Con el fin de agilizar la preparación de los nuevos derivados, se utilizaron metodologías de fase sólida, siguiendo el protocolo sintético anteriormente explicado en el apartado 2.4.2. Como se muestra en el Esquema 2.35, se seleccionaron inicialmente 10 aldehídos, entre los que **a-g** son benzaldehídos con diferentes sustituyentes en posición *para*. Los aldehídos **h,i** incorporan un anillo aromático adicional, bien en posición *para* o bien fusionado al fenilo inicial. Por último, el fenilacetaldehído (**j**) se eligió para estudiar la influencia de la distancia entre el anillo aromático y el N β-lactámico.



Esquema 2.35

Como se muestra en el Esquema 2.35, el primer paso de la secuencia sintética es la etapa de aminación reductora. Así, tras la eliminación en medio básico del grupo protector Fmoc se llevó a cabo la reacción con los aldehídos seleccionados utilizando TMOF como disolvente. La reducción de la iminas con NaBH_3CN , en presencia de ácido acético, condujo a las resinas **2.135a-e** y **2.135g-i**. Desafortunadamente, las reacciones con *p*-propoxibenzaldehído (**f**) y fenilacetaldehído (**j**) no transcurrieron satisfactoriamente, por lo que se decidió continuar la síntesis en fase sólida con las restantes resinas y preparar posteriormente estos derivados mediante síntesis en disolución. La acilación de las resinas **2.135a-e** y **2.135g-i** con el ácido 2-(*S*)-cloropropiónico, seguida de ciclación intramolecular en medio básico y posterior desanclaje con TFA, proporcionó los derivados deseados **2.138a-e** y **2.138g-i**, con buenos rendimiento y purezas (Tabla 2.12).

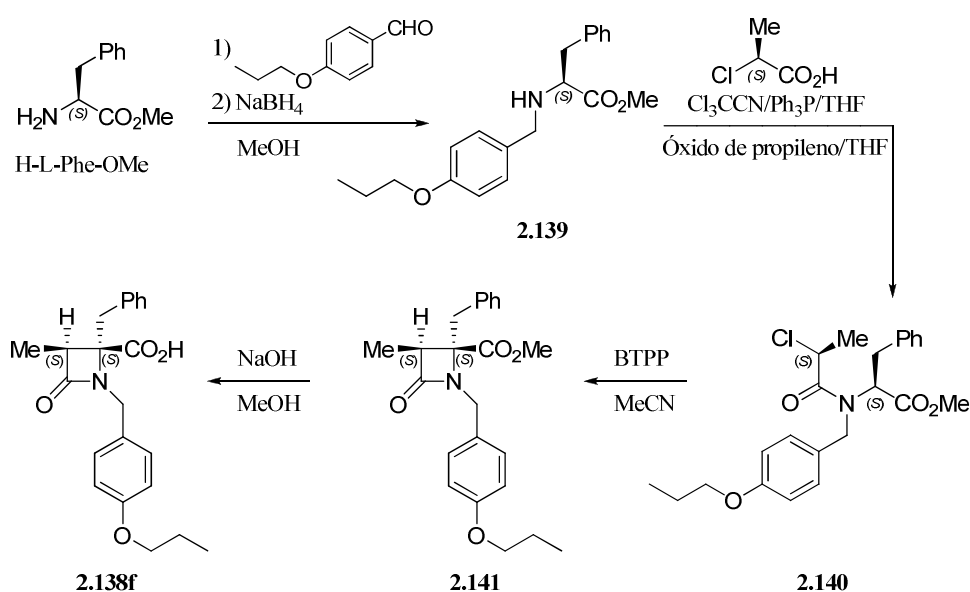
Tabla 2.12. Rendimiento y pureza obtenidos para los derivados **2.138a-e** y **2.138g-i**.

Compuesto	R ¹	Rendimiento (%) ^a	Pureza (%) ^b
2.138a		23	92
2.138b		59	97
2.138c		62	98
2.138d		28	67
2.138e		32	75
2.138g		42	94
2.138h		35	98
2.138i		32	85

^aRendimiento del producto aislado.

^b Determinada por HPLC (columna Sunfire, gradiente de 0 a 100% de A en 30 min).

Para llevar a cabo la preparación de la β -lactama derivada de *p*-propoxibenzaldehído se siguió el procedimiento de síntesis en disolución anteriormente comentado en el apartado 2.4.1.4 para la obtención de la β -lactama correspondiente a partir de Gly.



Esquema 2.36

Como se muestra en el Esquema 2.36, el *N*-*p*-propoxibencil derivado **2.139** se obtuvo mediante la reacción de *H*-L-Phe-OMe con *p*-propoxibenzaldehído, seguido de la reducción de la imina intermedia con NaBH_4 . Esta reacción de aminación reductora transcurrió con buen rendimiento (78%). A diferencia del procedimiento desarrollado en el apartado 2.4.1.4, la obtención del *N*-cloropropionil derivado **2.140** se llevó a cabo en dos etapas, lo que permitió incrementar considerablemente el rendimiento obtenido en la reacción de acilación. En primer lugar se generó el cloruro del ácido 2(*S*)-cloropropiónico, dejando reaccionar el correspondiente ácido con tricloroacetnitrilo y trifenilfosfina durante una hora. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se adicionó sobre el derivado **2.139** en presencia de óxido de propileno, obteniéndose finalmente el *N*-cloropropionil derivado **2.140** con alto rendimiento (87%). La ciclación intramolecular del derivado **2.140**, empleando como base BTTPP, dió lugar a la formación

de la β -lactama, **2.141** (70%). Finalmente, la saponificación del éster metílico en medio básico proporcionó el ácido carboxílico **2.138f** (83%).

Por último se procedió a la preparación de la β -lactama derivada de fenilacetaldehído. En un principio se decidió utilizar el mismo procedimiento sintético que en el caso anterior, pero desafortunadamente la reacción de aminación reductora tampoco transcurrió de modo satisfactorio en disolución. Cuando el crudo de reacción se analizó mediante HPLC-MS, en el cromatograma obtenido se observó la presencia de un compuesto muy mayoritario cuya masa se correspondía con la de la imina intermedia, resultante de la reacción entre H-L-Phe-OMe y fenilacetaldehído. Probablemente, esta especie haya evolucionado hacia la correspondiente enamina conjugada de idéntico peso molecular, que finalmente no se redujo en presencia de NaBH_4 (Figura 2.20).

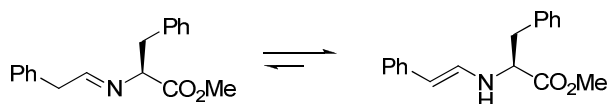
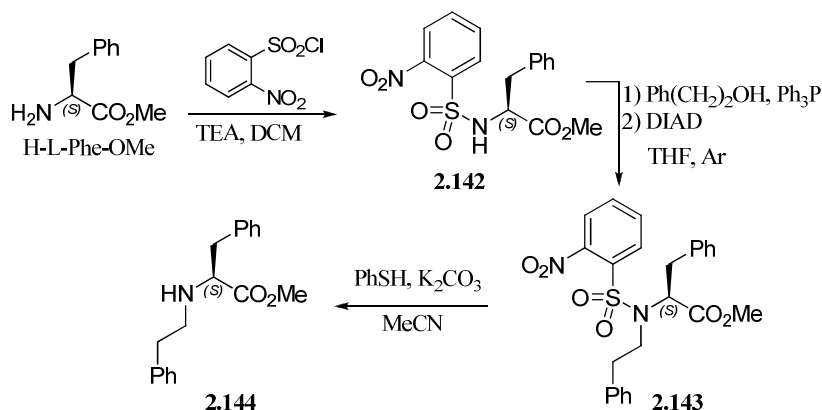


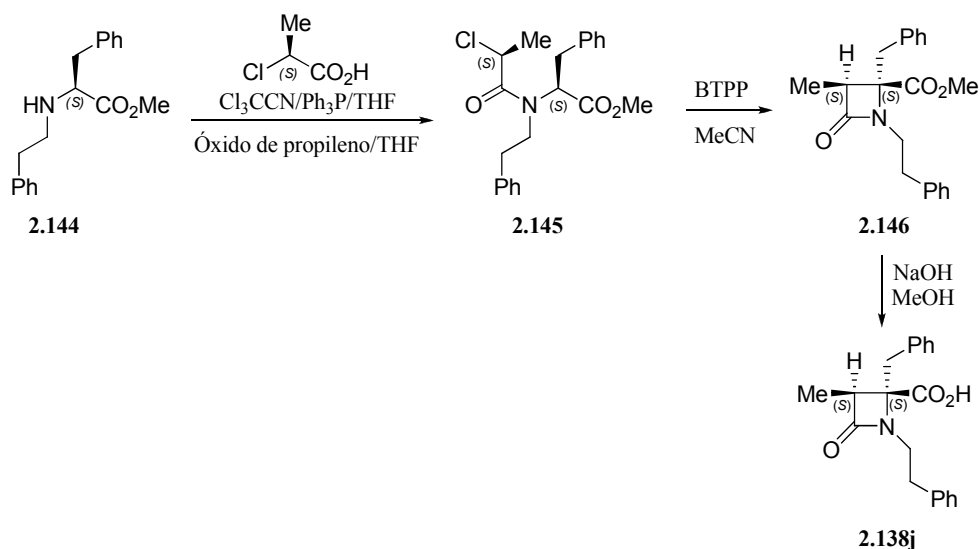
Figura 2.20. Posibles especies intermedias observadas en HPLC-MS.

Debido a la imposibilidad de obtener el *N*-fenetil derivado mediante una reacción de aminación reductora, se decidió llevar a cabo la síntesis de este compuesto mediante un procedimiento alternativo, basado en una reacción de Mitsunobu (Esquema 2.37)



Esquema 2.37

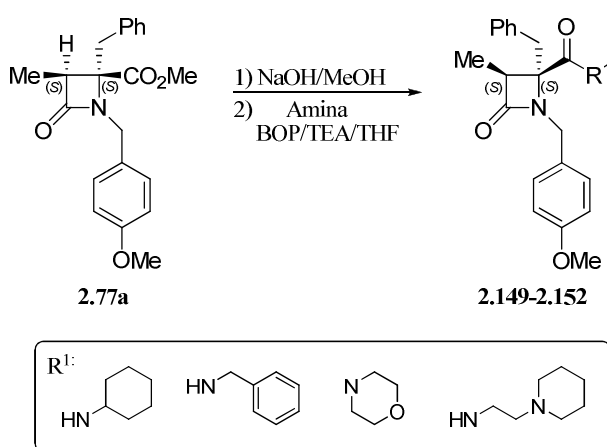
El primer paso de la estrategia sintética es la obtención del nosil derivado de Phe, **2.142**. Así, la reacción de H-L-Phe-OMe con cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo/TEA, dió lugar al derivado **2.142** con rendimiento cuantitativo. A continuación, la reacción de Mitsunobu entre el nosil derivado **2.142** y 2-feniletanol, en presencia de Ph_3P y DIAD, proporcionó el compuesto **2.143** con muy buen rendimiento (95%). Finalmente la desprotección del grupo nosilo, empleando tiofenol y carbonato potásico, generó el *N*-fenetil derivado **2.144** (85%). Una vez obtenido el *N*-fenetil derivado **2.144**, se siguió el procedimiento habitual para la síntesis de β -lactamas en disolución. Como se muestra en el Esquema 2.38, la acilación de **2.144** con el cloruro del ácido 2(*S*)-cloropropiónico, previamente generado, en presencia de óxido de propileno, dió lugar al *N*-cloropropionil derivado **2.145** con buen rendimiento (85%). La ciclación intramolecular del derivado **2.145** empleando como base BTTP, proporcionó la β -lactama, **2.146** (75%). Finalmente, tras la saponificación del éster metílico en medio básico se obtuvo el ácido carboxílico **2.138j** (95%).



Esquema 2.38

b) Sustitución del éster metílico por diferentes grupos amida

La segunda familia de análogos del compuesto **2.77a** pretende explorar la influencia en la actividad antitumoral de diferentes sustituyentes en el grupo carboxilo presente en posición 4 del anillo β -lactámico. Para ello se decidió sustituir el éster metílico, presente en el prototipo de partida, por diferentes grupos amida portadores de sustituyentes de naturaleza carbocíclica, bencílica y heterocíclica.



Esquema 2.39

Tabla 2.13. Rendimiento obtenido para los derivados **2.147-2.150**

Compuesto	R^1	Rendimiento (%) ^a
2.147		98
2.148		87
2.149		48
2.150		62

^aRendimiento del producto aislado.

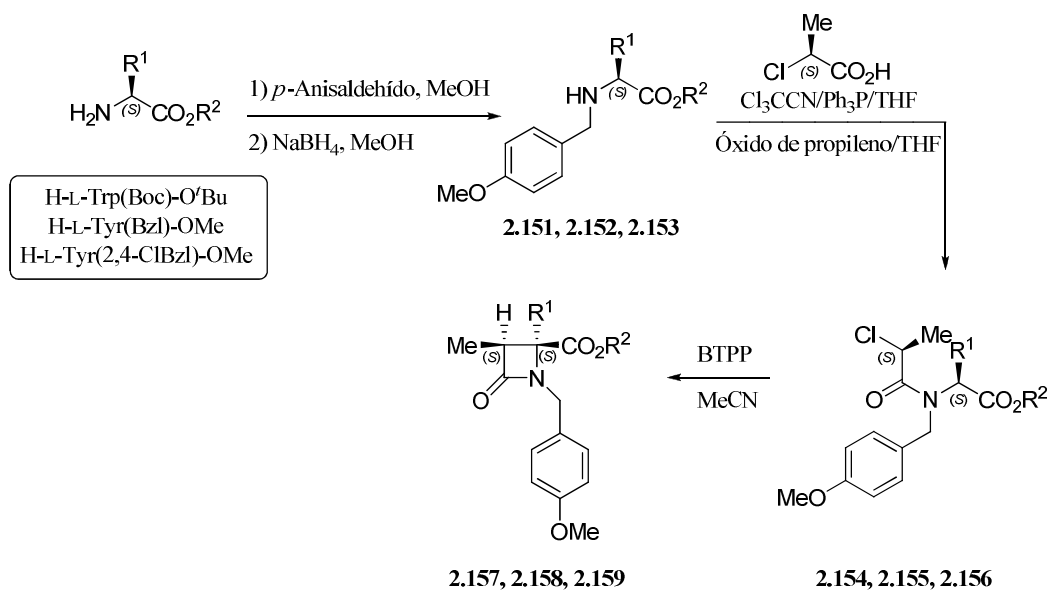
La síntesis de estos compuestos se realizó en disolución (Esquema 2.39). En primer lugar se llevó a cabo la saponificación del éster metílico del compuesto **2.77a** en

las condiciones habituales. El acoplamiento del ácido carboxílico obtenido con cada una de las aminas seleccionadas, utilizando BOP como agente de acoplamiento y TEA como base, condujo a los compuestos objetivo (**2.147-2.150**) con rendimientos de moderados a buenos (Tabla 2.13).

c) Sustitución del grupo 4-bencilo por otros grupos aromáticos

Para intentar estudiar la influencia del grupo 4-bencilo proveniente de la cadena lateral del aminoácido Phe en la actividad antitumoral, la tercera y última familia de análogos estructurales diseñada incorpora diferentes grupos de naturaleza aromática en posición 4 del anillo de azetidinona. Para ello se decidió llevar a cabo las síntesis de las correspondientes azetidinonas derivadas de otros aminoácidos con cadena lateral de naturaleza aromática. Se seleccionaron como aminoácidos de partida Trp, con el indol de la cadena lateral protegido con un grupo Boc, y dos derivados de Tyr sustituidos con diferentes grupos bencilo en la cadena lateral.

La síntesis de estos compuestos se realizó en disolución siguiendo el mismo procedimiento aplicado anteriormente en la síntesis de la azetidinona derivada de *p*-propoxibenzaldehído (**2.141**). Así, la primera etapa de la ruta sintética es la obtención de los *N*-*p*-metoxibencil derivados **2.151-2.153**, mediante una reacción de aminación reductora (Esquema 2.40). La acilación de los *N*-*p*-metoxibencil derivados **2.151-2.153** con el cloruro del ácido 2(*S*)-cloropropiónico, previamente generado, en presencia de óxido de propileno, proporcionó los *N*-cloropropionil derivados **2.154-2.156** con buenos rendimientos (68-93%). Finalmente, la ciclación intramolecular de los compuestos **2.154-2.156** empleando como base BTPP, dio lugar a las β -lactamas objetivo **2.157-2.159**, también con buenos rendimientos en todos los casos (58-98%).

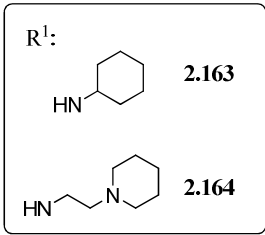


Compuesto	R ¹	R ²
2.151, 2.154, 2.157		^t Bu
2.152, 2.155, 2.158		Me
2.153, 2.156, 2.159		Me

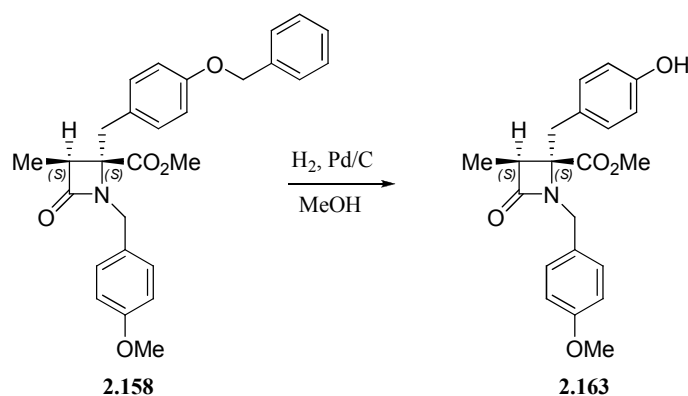
Esquema 2.40

Una vez obtenidas las β -lactamas objetivo **2.157-2.159**, se decidió realizar algunas transformaciones posteriores en estos derivados para obtener una mayor diversidad estructural en los compuestos preparados dentro de esta serie.

Por una parte, partiendo de la β -lactama derivada de Tyr **2.159**, se sustituyó el éster metílico en posición 4 de la azetidinona por dos grupos amida ya utilizados en la



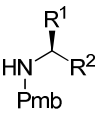
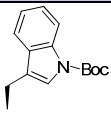
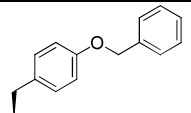
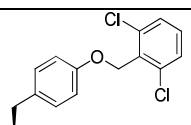
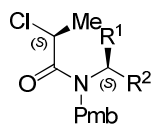
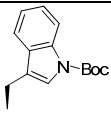
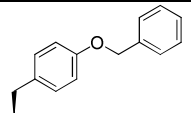
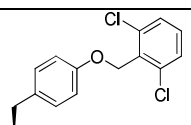
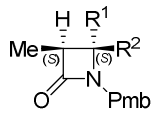
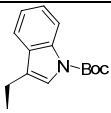
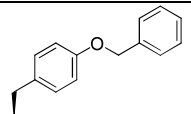
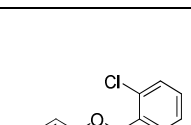
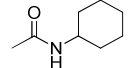
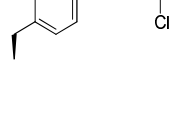
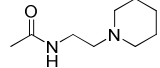
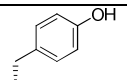
Por otra parte, partiendo de la β -lactama **2.158**, se decidió eliminar el grupo bencilo del residuo de Tyr mediante hidrogenación catalítica, empleando Pd/C como catalizador. De este modo se obtuvo la azetininona **2.163** con rendimiento prácticamente cuantitativo (Esquema 2.42).



Esquema 2.42

En la Tabla 2.14 se recogen a modo de resumen todos los compuestos preparados en este apartado y los rendimientos obtenidos en cada caso.

Tabla 2.14. Compuestos preparados en este apartado y rendimientos obtenidos.

Derivado	Compuesto	R ¹	R ²	Rendimiento (%) ^a
	2.151		CO ₂ ^t Bu	58
	2.152		CO ₂ Me	66
	2.153		CO ₂ Me	76
	2.154		CO ₂ ^t Bu	68
	2.155		CO ₂ Me	88
	2.156		CO ₂ Me	93
	2.157		CO ₂ ^t Bu	58
	2.168		CO ₂ Me	73
	2.159		CO ₂ Me	89
	2.160		CO ₂ H	91
	2.161			67
	2.162			71
	2.163		CO ₂ Me	98

^aRendimiento del producto aislado en cada etapa

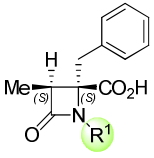
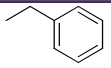
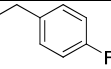
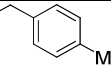
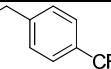
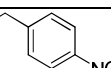
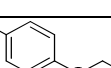
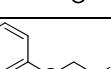
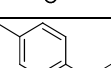

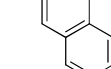
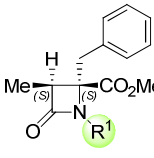
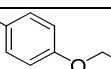
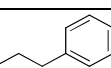
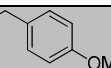
d) Evaluación antitumoral de las nuevas series de derivados β -lactámicos

Finalmente, las tres series de análogos preparadas fueron enviados a la compañía PharmaMar S.A. para su evaluación *in vitro* como agentes antitumorales en las tres líneas celulares cancerosas ya comentadas (MDA-MB-231, A549 y HT29). Los resultados de actividad están recogidos en la Tablas 2.15-2.17, junto con los datos de actividad biológica del prototipo de partida **2.77a**, y de doxorubicina, utilizada como control.

En la Tabla 2.15 se recogen los datos de inhibición de la proliferación celular obtenidos para los análogos modificados en el sustituyente del nitrógeno β -lactámico **2.138a-j**, **2.141** y **2.146**. Como se observa en esta Tabla, los compuestos **2.138a** y **2.138b**, sin sustituyente en *para* o con un átomo de F en esta posición, muestran actividad antiproliferativa en las tres líneas tumorales en el rango micromolar alto. El derivado con un grupo *p*-propiloxi **2.138f** mostró cierta inhibición en la línea celular de colon HT29, aunque un orden de magnitud inferior a la del prototipo de partida **2.77a**. Sin embargo, su análogo con éster metílico **2.141** recuperó la capacidad inhibitoria en las tres líneas celulares, sugiriendo que la presencia de un ácido carboxílico libre no es especialmente adecuada.

La sustitución del grupo *p*-metoxi por Me, CF₃, NO₂ y O(CH₂)₂-N-morfolina condujo en todos los casos a compuestos inactivos. Así mismo, tanto la incorporación de grupos fenilo adicionales, en **2.138h** y **2.138i**, como el aumento en la distancia entre el fenilo del sustituyente en posición 1 y el anillo β -lactámico (**2.138j** y **2.146**) fueron en detrimento de la capacidad antitumoral. Parece, por tanto, que la actividad antiproliferativa de esta serie de compuestos está ligada a la presencia de un grupo bencilo en posición 1, bien no sustituido o sustituido en *para* por grupos alcóxido o F. Está aún por explorar la posible influencia de sustituyentes en posiciones *orto* y *meta* del grupo bencilo y también habría que investigar si la actividad de **2.138a** y **2.138b** puede mejorarse mediante la formación de los correspondientes ésteres metílicos.

Tabla 2.15. Inhibición de la proliferación celular (GI_{50} , μM) por los compuestos modificados en el sustituyente en N-1 (**2.138a-j**, **2.141**, **2.146**).

Formula general	Compuesto	R ¹	Mama MDA-MB-231	Pulmón A549	Colon HT29
	2.138a		14.9	25.5	9.70
	2.138b		18.3	22.9	6.42
	2.138c		>30.9	>30.9	>30.9
	2.138d		>26.5	>26.5	>26.5
	2.138e		>28.2	>28.2	>28.2
	2.138f		>27.2	>27.2	22.0
	2.138g		>22.8	>22.8	>22.8
	2.138h		>25.9	>25.9	>25.9
	2.138i		>27.8	>27.8	>27.8
	2.138j		>30.9	>30.9	>30.9
	2.141		9.18	18.4	12.1
	2.146		>29.6	>29.6	>29.6
	2.77a		7.07	5.38	1.58
Doxorrubicina			0.49	0.66	1.13

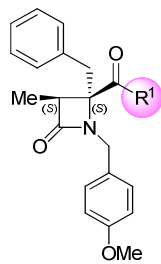
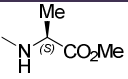
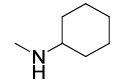
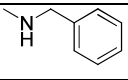
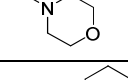
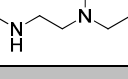
GI_{50} : Concentración requerida para inhibir la proliferación celular en un 50%.

En la Tabla 2.16 se recogen los datos de actividad antitumoral obtenidos para los análogos que incorporan diferentes grupos amida en posición 4 del anillo de azetidinona (**2.147-2.150**). En este ensayo se decidió incluir también el dipeptido **2.89a**, derivado del

prototipo **2.77a**, anteriormente preparado en el apartado 2.4.1.2. Como se observa en la Tabla, los compuestos **2.147** y **2.150** que incorporan grupos ciclohexilo y 2-(piperidin-1-il)etilo, respectivamente, mostraron actividad citotóxica en las tres líneas celulares ensayadas, aunque ésta fue ligeramente inferior a la del prototipo de partida **2.77a**. El dipéptido **2.89a** tan solo presentó actividad significativa frente a la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama. Por otra parte, los compuestos **2.148** y **2.149**, derivados de bencilamina y morfolina, respectivamente, resultaron inactivos.

Los resultados positivos obtenidos con **2.147** y **2.150** dejan abierta la posibilidad de preparación de nuevas amidas diferentemente sustituidas para intentar mejorar la inhibición de la proliferación tumoral.

Tabla 2.16. Inhibición de la proliferación celular (GI_{50} , μM) por los compuestos modificados en el grupo 4-carboxilato (**2.89a**, **2.147-2.150**).

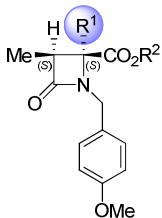
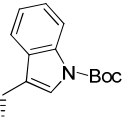
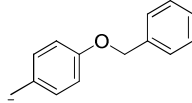
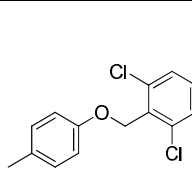
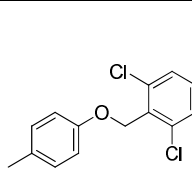
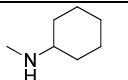
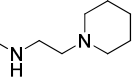
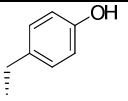

Formula general	Compuesto	R ¹	Mama MDA-MB-231	Pulmón A549	Colon HT29
	2.89a		11.5	>23.6	>23.6
	2.147		13.3	14.7	8.56
	2.148		>23.4	>23.4	>23.4
	2.149		>24.5	>24.5	>24.5
	2.150		12.9	19.6	9.56
	2.77a	OMe	7.07	5.38	1.58
Doxorrubicina			0.49	0.66	1.13

GI_{50} : Concentración requerida para inhibir la proliferación celular en un 50%.

Finalmente, en la Tabla 2.17 se resumen los datos de actividad obtenidos para las azetidinonas derivadas de otros aminoácidos aromáticos. Las β -lactamas derivadas de Trp (**2.157**) y Tyr O-bencilada (**2.158**) resultaron activas en dos de las líneas celulares ensayadas, A549 y HT29, mientras que el correspondiente análogo de Tyr diclorado (**2.161**) tan solo mostró actividad significativa en las células de colon HT29. En estos tres

casos los valores de inhibición resultaron algo inferiores a los del prototipo de partida. El derivado de Tyr sin grupo protector en la cadena lateral **2.163**, resultó totalmente inactivo, lo que parece indicar que la presencia de sustituyentes polares (OH) en el grupo 4-bencilo va en detrimento de la actividad. Comparando entre sí la actividad de los derivados de Tyr con el grupo diclorobencilo **2.159** y **2.160**, se observa nuevamente una pérdida de actividad al pasar de éster metílico a ácido carboxílico, mientras que la sustitución del grupo éster metílico por grupos amida (**2.161**, **2.162**) supone un notable aumento de la potencia citotóxica. Este aumento de actividad fue mucho más acusado que en caso de las amidas **2.147** y **2.150** (Tabla 2.16), derivadas de **2.77a**. Dentro de esta última serie destaca el compuesto **2.162**, activo en la tres líneas tumorales con el mismo nivel de eficacia que el prototipo de partida, **2.77a**.

Tabla 2.17. Inhibición de la proliferación celular (GI_{50} , μM) por los compuestos modificados en el grupo 4-bencilo **2.157-2.163**.

Derivado	Comp.	R ¹	R ²	Mama MDA-MB-231	Pulmón A549	Colon HT29
	2.157		CO ₂ ^t Bu	>18.7	16.6	10.3
	2.158		CO ₂ Me	>21.8	10.4	14.6
	2.159		CO ₂ Me	>18.5	>18.9	15.7
	2.160		CO ₂ H	>19.4	>19.4	>19.4
	2.161			>16.8	13.4	11.4
	2.162			6.24	4.21	3.12
	2.163		CO ₂ Me	>16.8	>16.8	>16.8
	2.77a		CO ₂ Me	7.07	5.38	1.58
Doxorrubicina				0.49	0.66	1.13

GI₅₀: Concentración requerida para inhibir la proliferación celular en un 50%.

Como resumen a este apartado, se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación biológica de tres series de análogos estructurales del derivado β -lactámico **2.77a** con actividad antitumoral moderada. En base a los resultados obtenidos se pueden extraer como conclusiones que en posiciones 1 y 4 del anillo β -lactámico se observa una clara preferencia por sustituyentes aromáticos de tipo bencilo, mientras que el grupo carboxilo en posición 4 parece admitir mayor variedad de sustituyentes (OMe, diferentes amidas), si bien los derivados con un grupo carboxilo libre suelen ser inactivos.

Los compuestos **2.77a** y **2.162** son susceptibles de otras modificaciones, como la incorporación de diferentes sustituyentes en posición 3 del anillo de azetidinona, la introducción de grupos con mayor diversidad estructural en el agrupamiento *N*-carboxamida y en la cadena lateral de la Tyr. Por todo ello, estos dos derivados pueden ser considerados como cabezas de serie prometedores para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

2.5. CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes de este capítulo, se resumen en las siguientes conclusiones que, de manera gráfica se representan en la Figura 2.21:

- Se ha desarrollado un procedimiento versátil y eficaz para la síntesis diastereo- y enantioselectiva de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas derivadas de aminoácidos, siendo el paso clave la alquilación intramolecular asistida por base de *N*-2-cloropropionil-*N*-*p*-metoxibencil derivados enantioméricamente puros. El curso estereoquímico de esta etapa viene determinado exclusivamente por la configuración del centro estereogénico del grupo 2-cloropropionilo.
- Los resultados obtenidos en el estudio teórico de la reacción apoyan los datos experimentales y la diferencia de energía de los estados de transición justifica la formación exclusiva de las β -lactamas 3,4-*cis*.
- El procedimiento descrito para la preparación enantioselectiva de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas se puede aplicar también a la síntesis de análogos 1,3,4-trisustituidos enantioméricamente puros a partir de derivados de Gly.
- La metodología desarrollada en disolución para la síntesis de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas a partir de aminoácidos se ha extendido con éxito a la síntesis en fase sólida. Empleando esta última metodología se ha generado una pequeña quimioteca de β -lactamas con diversidad estructural, obteniéndose los productos finales con rendimientos satisfactorios y elevada pureza.
- La evaluación biológica en programas de cribado de alto rendimiento de los componentes de esta quimioteca (y de otros preparados en este capítulo) ha permitido identificar compuestos con actividad moderada anti-CMVH (**2.127**, **2.133d**), bloqueantes del canal TRPM8 (**2.116c**, **2.117e**) y un inhibidor de la proliferación en diferentes cultivos de células tumorales (**2.77a**).

- Los intentos de optimización de este último derivado β -lactámico han permitido extraer algunas relaciones estructura-actividad antitumoral y el descubrimiento de otro posible cabeza de serie (**2.162**) para modificaciones posteriores.

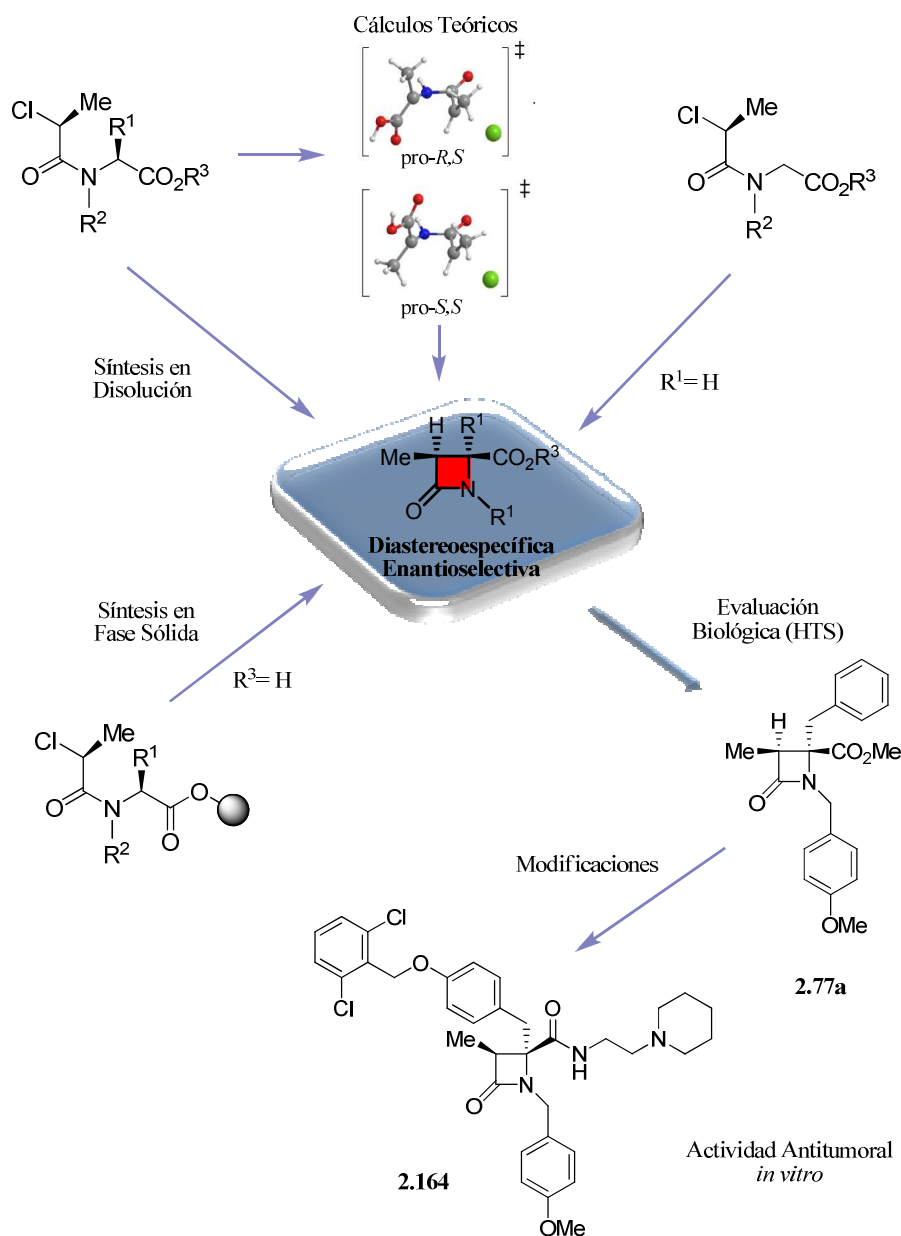


Figura 2.21. Resumen del trabajo realizado y resultados del Capítulo 2

2.6. PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades: Los espectros de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Varian INOVA-300 (300 MHz) o Bruker 300 (300 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los espectros de ^{13}C RMN se registraron en un Varian INOVA-300 (75 MHz) o Bruker 300 (75 MHz). Los espectros de masas (Electrospray, modo positivo) se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard 1100SD o en un HPLC-MS Waters integrado por un módulo de separación 2695, un detector Photodiodo Array 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ 2000. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en columna de gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh) y en cartuchos de gel sílice, Discovery DSC-Si o de fase reversa, Discovery DSC-18, de SUPELCO. Los HPLC analíticos se realizaron en un aparato Waters, utilizando las columnas de fase reversa Novapak C_{18} (3.9 x 150 mm, 4 μM), Deltapak C_{18} (3.9 x 150 mm, 4 μM) o Sunfire C_{18} (3.9 x 150 mm, 4 μM). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas $\text{CH}_3\text{CN(A)}/\text{H}_2\text{O(0.05\% TFA)(B)}$. Los HPLC quirales se llevaron a cabo en un aparato Waters utilizando la columna Chiralpak IA (4.6 x 150mm), con las mezclas de eluyentes que se especifican en cada caso. En todos los casos el flujo fue de 1mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 214 nm. Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un aparato Perkin-Elmer Spectrum One. Los análisis elementales han sido realizados en un analizador Carlo Erba EA1108 y en un LECO CHNS-932. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Reichert-Jung Kofler y están sin corregir.

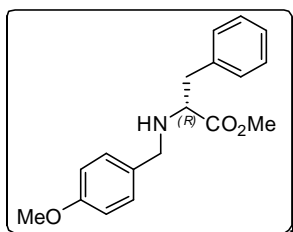
2.6.1. Síntesis en disolución de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas

2.6.1.1 Preparación de *N*-alquil derivados de aminoácidos

A una disolución del hidrocloreto del aminoácido correspondiente (19.40 mmol) en MeOH (30 ml), se le añade TEA (2.7 ml, 19.40 mmol) y el aldehído empleado en cada caso (29.09 mmol). La mezcla se agita durante 1,5 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la reacción se enfría a 0°C, se le adiciona lentamente NaBH_4 (1.47 g, 38.79 mmol) y se deja recuperar temperatura ambiente. Después de 30 minutos de agitación, se elimina el disolvente y el residuo obtenido se extrae con AcOEt y se lava con H_2O y disolución saturada de NaCl, sucesivamente. Por último, la fase orgánica se

seca sobre Na_2SO_4 y se evapora a sequedad. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando el sistema de eluyente indicado en cada caso. De esta forma se han obtenido los siguientes compuestos:

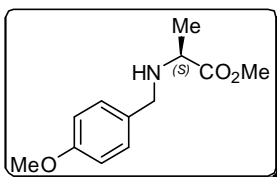
***N*-*p*-Metoxibencil-D-Phe-OMe (2.75)**



Aceite. Rdto: 82%. Eluyente: gradiente de 6 a 10 % de AcOEt en hexano. $[\alpha]_D = -7.6$ (c 0.92, CHCl_3).

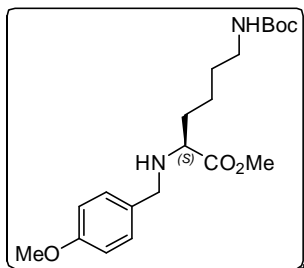
Los datos espectroscópicos y analíticos de este derivado son idénticos a los de su enantiómero **1.30**.

***N*-*p*-Metoxibencil-L-Ala-OMe (2.78)**



Aceite. Rdto: 84%. Eluyente: gradiente de 6 a 10 % de AcOEt en hexano. $[\alpha]_D = -8.1$ (c 0.8, CHCl_3). HPLC (Novapak): $t_R = 2.60$ min (A:B=40:60). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (d, 2H, $J = 8.3$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.88 (d, 2H, $J = 8.3$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 3.82 (s, 3H, OMe), 3.76 (d, 1H, $J = 12.6$, N- CH_2), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.63 (d, 1H, $J = 12.6$, N- CH_2), 3.41 (m, 1H, α -*H* Ala), 1.72 (s ancho, 1H, NH), 1.34 (d, 3H, $J = 6.9$, β -*H* Ala). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 176.1 (CO), 158.7, 131.8, 129.3, 113.7 (C Ar), 55.7 (OMe), 55.1 (α -C Ala), 51.6 (OMe), 51.3 (N- CH_2), 19.0 (β -C Ala). EM (ES modo positivo): 224.0 $[\text{M}+1]^+$. Anal. (%) Calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_3$: C, 64.55; H, 7.67; N, 6.27. Anal. Exp. (%): C, 64.46; H, 7.81; N, 6.20.

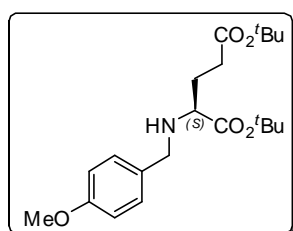
***N*-*p*-Metoxibencil-L-Lys(Boc)-OMe (2.79)**



Aceite. Rdto: 87%. Eluyente: gradiente de 6 a 33 % de AcOEt en hexano. $[\alpha]_D = -9.24$ (c 0.6, CHCl_3). HPLC (Deltapak): $t_R = 3.82$ min (A:B=40:60). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.23 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.85 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 4.51 (m, 1H, NH-Boc), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.73 (d, 1H, $J = 12.6$, N- CH_2), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.55 (d, 1H, $J = 12.6$, N- CH_2), 3.23 (m, 1H, α -*H* Lys), 3.08 (m, 2H, ϵ -*H* Lys), 1.62 (m, 3H, NH, β -*H* Lys), 1.43 (s, 9H, CH_3 t Bu), 1.41 (m, 4H, γ -*H* y δ -*H* Lys). ^{13}C RMN (75

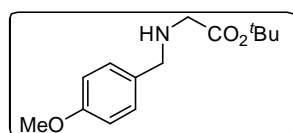
MHz, CDCl₃): δ 175.7 (CO₂Me), 158.5 (C-OMe), 155.7 (CO Boc), 131.7, 129.2, 113.5 (C Ar), 78.9 (C ^tBu), 60.1(α -C Lys), 55.0 (OMe), 51.3 (N-CH₂), 40.1 (ϵ -C Lys), 32.9 (β -C Lys), 29.5 (δ -C Lys), 28.2 (CH₃-^tBu), 22.8 (γ -C Lys). EM (ES modo positivo): 381.5 [M+Na]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₀H₃₂N₂O₅: C 63.13, H 8.48, N 7.36; Anal. Exp. (%): C 63.07, H 8.51, N 7.32

***N-p*-Metoxibencil-L-Glu(O^tBu)-O^tBu (2.80)**



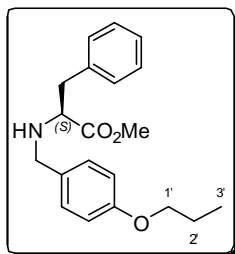
Aceite. Rdto: 80%. Eluyente: gradiente de 9 a 14 % de AcOEt en hexano. $[\alpha]_D = -21.92$ (*c* 1.12, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 4.52$ min (A:B=50:50). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.17 (d, 2H, *J* = 8.7, 2H y 6H Pmb), 6.78 (d, 2H, *J* = 8.7, 2H y 6H Pmb), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.68 (d, 1H, *J* = 12.6, N-CH₂), 3.47 (d, 1H, *J* = 12.6, N-CH₂), 3.03 (m, 1H, α -H Glu), 2.27 (m, 2H, γ -H Glu), 1.82 (m, 2H, NH, β -H Glu), 1.75 (m, 1H, β -H Glu), 1.41, 1.35 (s, 9H, CH₃ ^tBu). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 174.4, 172.5 (CO), 158.6, 132.0, 128.9, 113.6 (C Ar), 81.0, 80.0 (C ^tBu), 60.3 (α -C Glu), 55.1 (OMe), 51.3 (N-CH₂), 31.5 (γ -C Glu), 28.5 (β -C Glu), 28.0, 27.9 (CH₃ ^tBu). EM (ES modo positivo): 380.5 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₁H₃₃NO₅: C, 66.46; H, 8.76; N, 3.69. Anal. Exp. (%): C, 66.48; H, 8.81; N, 3.73.

***N-p*-Metoxibencil-Gly-O^tBu (2.95)**



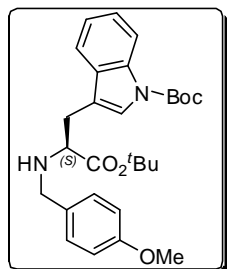
Aceite. Rdto: 65%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:3). HPLC (Novapak): $t_R = 3.25$ min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.27 (d, 2H, *J* = 8.8, 2H y 6H Pmb), 6.89 (d, 2H, *J* = 8.8, 3H y 5H Pmb), 4.60 (d, 1H, *J* = 12.2, N-CH₂), 3.82 (s, 3H, OMe), 3.81 (d, 1H, *J* = 12.2, N-CH₂), 3.72 (d, 1H, *J* = 11.4, α -H Gly), 3.29 (d, 1H, *J* = 11.4, α -H Gly), 2.28 (s ancho, 1H, NH), 1.49 (s, 9H, CH₃ ^tBu). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 169.6 (CO), 159.4, 128.5, 128.2, 113.6 (C Ar), 82.3 (C ^tBu), 56.8 (OMe), 52.4 (N-CH₂), 48.5 (α -C Gly), 28.7, 27.6 (CH₃ ^tBu). EM (ES modo positivo): 274.2 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₁₄H₂₁NO₃: C 66.91, H 8.42, N 5.57. Exp (%): C 66.98, H 8.47, N 5.52.

***N*-*p*-Propoxibencil-L-Phe-OMe (2.139)**



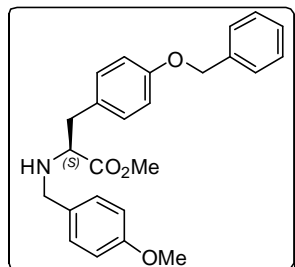
Aceite. Rdto: 78%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:5). $[\alpha]_D = -4.8$ (c 1.02, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 4.07$ min (Gradiente de 20 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.20-7.07 (m, 5H, Ph), 7.04 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Ar), 6.73 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Ar), 3.84 (t, 2H, $J = 7.3$, 1'-*H*), 3.66 (d, 1H, $J = 12.9$, N-CH₂), 3.56 (s, 3H, OMe), 3.49 (d, 1H, $J = 12.9$, N-CH₂), 3.46 (m, 1H, α -*H* Phe), 2.87 (d, 2H, $J = 6.8$, β -*H* Phe), 1.72 (m, 3H, NH, 2'-*H*), 0.95 (t, 3H, $J = 7.5$, 3'-*H*). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 175.1 (CO), 158.2, 137.3, 131.4, 129.3, 129.2, 128.3, 126.6, 114.3 (C Ar), 69.5 (1'-C), 61.9 (α -C Phe), 51.6 (OMe), 51.4 (N-CH₂), 39.7 (β -C Phe), 22.6 (2'-C), 10.5 (3'-C). EM (ES modo positivo): 328.3 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₀H₂₅NO₃: C, 73.37; H, 7.70; N, 4.28. Anal. Exp. (%): C, 73.45; H, 7.74; N, 4.14.

***N*-*p*-Metoxibencil-L-Trp(Boc)-O^tBu (2.151)**



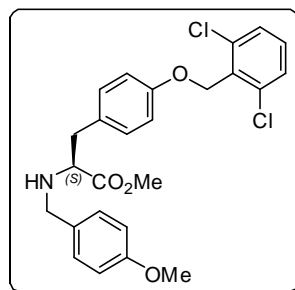
Aceite. Rdto: 58%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:5). $[\alpha]_D = -5.1$ (c 1.06, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 8.33$ min (Gradiente de 2 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 8.13 (d ancho, 1H, $J = 8.0$, 4-*H* indol), 7.53 (m, 1H, 7-*H* indol), 7.43 (m, 1H, 2-*H* indol), 7.30 (m, 1H, 5-*H* y 6-*H* indol), 7.19 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.81 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.77 (d, 1H, $J = 12.7$, N-CH₂), 3.62 (d, 1H, $J = 12.7$, N-CH₂), 3.53 (m, 1H, α -*H* Trp), 3.01 (d, 2H, $J = 6.9$, β -*H* Trp), 1.84 (s ancho, 1H, NH), 1.65, 1.38 (s, 9H, CH₃-^tBu). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 174.0 (CO₂-^tBu), 158.7 (C-OMe), 149.6 (CO Boc), 135.4, 131.9, 129.3, 124.2, 123.9, 119.1, 115.1, 113.7 (C Ar), 83.3, 81.2 (C-^tBu), 61.1 (α -C Trp), 55.2 (OMe), 51.4 (NCH₂), 29.1 (β -C Trp), 28.2, 28.0 (CH₃-^tBu). EM (ES modo positivo): 481.6 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₈H₃₆N₂O₅: C, 69.98; H, 7.55; N, 5.83. Anal. Exp. (%): C, 70.05; H, 7.48; N, 5.59.

***N-p*-Metoxibencil-L-Tyr(Bzl)-OMe (2.152)**



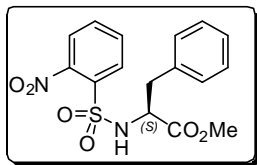
Sólido céreo. Rdto: 66%. Eluyente: CH₂Cl₂:Et₂O:Hexano (1:1:1). [α]_D = +3.1 (c 1.12, CHCl₃). HPLC (Sunfire): *t*_R = 7.00 min (Gradiente de 2 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.45-7.29 (m, 5H, Ph), 7.14 (d, 2H, *J* = 8.7, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.9, 2-*H* y 6-*H* Ar Tyr), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.9, 3-*H* y 5-*H* Ar Tyr), 6.81 (d, 2H, *J* = 8.7, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 5.04 (s ancho, 2H, OCH₂), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.74 (d, 1H, *J* = 12.9, N-CH₂), 3.57 (d, 1H, *J* = 12.9, N-CH₂), 3.64 (s, 3H, OMe), 3.49 (m, 1H, α-*H* Tyr), 2.90 (d, 2H, *J* = 6.8, β-*H* Tyr), 1.74 (s ancho, 1H, NH). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 175.0 (CO), 158.6, 157.6 137.0, 131.7, 130.1, 129.6, 129.3, 128.5, 127.8, 127.4, 114.7, 113.7 (*C* Ar), 69.9 (OCH₂), 62.0 (α-*C* Tyr), 55.2, 51.5 (OMe), 51.4 (NCH₂), 38.8 (β-*C* Tyr). EM (ES modo positivo): 406.5 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₅H₂₇NO₄: C, 74.05; H, 6.71; N, 3.45. Anal. Exp. (%): C, 74.18; H, 6.68; N, 3.22.

***N-p*-Metoxibencil-L-Tyr(2,4-diclorobencil)-OMe (2.153)**



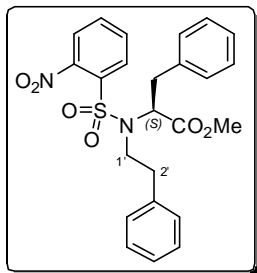
Sólido. Rdto: 76%. Eluyente: CH₂Cl₂:Et₂O:Hexano (1:1:1). P.f.: 82-84 °C. [α]_D = +9.4 (c 1.02, CHCl₃). HPLC (Sunfire): *t*_R = 7.69 min (Gradiente de 2 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.42-7.30 (m, 3H, Cl₂C₆H₃), 7.20 (d, 2H, *J* = 8.7, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 7.15 (d, 2H, *J* = 8.8, 2-*H* y 6-*H* Ar Tyr), 6.99 (d, 2H, *J* = 8.8, 3-*H* y 5-*H* Ar Tyr), 6.87 (d, 2H, *J* = 8.7, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 5.30 (s ancho, 2H, OCH₂), 3.84 (s, 3H, OMe), 3.80 (d, 1H, *J* = 12.9, N-CH₂), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.63 (d, 1H, *J* = 12.9, N-CH₂), 3.56 (m, 1H, α-*H* Tyr), 2.97 (m, 2H, β-*H* Tyr), 1.84 (s ancho, 1H, NH). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 175.0 (CO), 158.6, 157.7, 136.9, 132.2, 131.7, 130.3, 130.2, 130.0, 129.3, 128.4, 114.9, 113.7 (*C* Ar), 65.2 (OCH₂), 62.0 (α-*C* Tyr), 55.2, 51.6 (OMe), 51.4 (NCH₂), 38.8 (β-*C* Tyr). EM (ES modo positivo): 475.4 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₅H₂₅Cl₂NO₄: C, 63.30; H, 5.31; N, 2.95. Anal. Exp. (%): C, 63.39; H, 5.22; N, 2.76.

Síntesis de *N*-(2-nitrofenil)sulfonil-L-Phe-OMe (**2.142**)



A una disolución de hidrocloreto de H-Phe-OMe (1.08 g, 5.0 mmol) en CH_2Cl_2 (40 ml) se añade TEA (0.69 ml, 5 mmol). Transcurridos 15 minutos, se enfría la mezcla a 0 °C y se adicionan TEA (0.91 ml 6.5 mmol) y cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo (1.44 g, 6.5 mmol). Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 12 h. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt y se lava con ácido cítrico (10%), NaHCO_3 (10%) y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , se evapora a sequedad, obteniéndose el derivado **2.142** en forma de aceite con rendimiento cuantitativo, que será empleado sin mayor purificación en la siguiente etapa de la ruta sintética. $[\alpha]_{\text{D}} = -45.7$ (*c* 1.02, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_{\text{R}} = 2.62$ min (Gradiente de 50 a 100% A en 5 min). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.95 (m, 1H, 3-*H* Ar), 7.84 (m, 1H, 6-*H* Ar), 7.67 (m, 2H, 4-*H*, 5-*H* Ar), 7.25-7.09 (m, 5H, Ph), 6.01 (s ancho, 1H, $J = 8.7$, NH), 4.46 (m, 1H, α -*H* Phe), 3.52 (s, 3H, OMe), 3.16 (dd, 1H, $J = 5.6, 13.8$, β -*H* Phe), 3.07 (dd, 1H, $J = 6.9, 13.8$, β -*H* Phe). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.3 (CO), 147.3, 134.7, 134.0, 133.4, 132.9, 130.2, 128.6, 127.4, 125.5 (*C* Ar), 57.8 (OMe), 52.4 (α -*C* Phe), 39.1 (β -*C* Phe). EM (ES modo positivo): 387.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

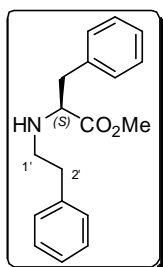
Síntesis de *N*-fenetil-*N*-(2-nitrofenil)sulfonil-L-Phe-OMe (**2.143**)



A una disolución del nosil derivado **2.142** (1.82 g, 5 mmol) en THF seco (30 ml), se añade 2-feniletanol (0.41 ml, 3.33 mmol) y Ph_3P (1.31 g, 5 mmol) bajo atmósfera de Ar y a 0°C. A continuación, se adiciona DIAD (0.98 ml, 5 mmol). Tras 18 h de reacción, se evapora el disolvente y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente AcOEt:hexano (1:4), obteniéndose 1.13 g (95%) del producto **2.143** en forma de aceite viscoso. $[\alpha]_{\text{D}} = -21.5$ (*c* 0.99, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_{\text{R}} = 7.14$ min (Gradiente de 50 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.82 (m, 1H, 3-*H* Ar), 7.63 (m, 1H, 6-*H* Ar), 7.56 (m, 2H, 4-*H*, 5-*H* Ar), 7.30-7.20 (m, 10H, Ph), 3.70-3.56 (m, 4H, 1'-*H*, α -*H* Phe, β -*H* Phe), 3.54 (s, 3H, OMe), 3.08-2.86 (m, 3H, 2'-*H*, β -*H* Phe). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.7 (CO), 156.3, 148.2, 138.3, 136.1, 133.5,

132.9, 131.5, 130.7, 129.1, 128.8, 128.6, 128.3, 127.0, 126.7, 124.0 (*C* Ar), 52.3 (OMe), 52.1 (α -*C* Phe), 41.5 (1'-*C*), 36.6 (2'-*C*), 36.6 (β -*C* Phe). EM (ES modo positivo): 469.2 $[M+1]^+$. Anal. (%) Calc. para $C_{24}H_{24}N_2O_6S$: C, 61.52; H, 5.16; N, 5.98. Anal. Exp. (%): C, 61.61; H, 5.09; N, 5.64.

Síntesis de *N*-fenetil-L-Phe-OMe (**2.144**)



A una disolución del derivado **2.143** (0.70 g, 1.5 mmol) en MeCN se añade K_2CO_3 (0.62 g, 4.5 mmol) y tiofenol (0.31 ml, 3 mmol). Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 20 h. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt y se lava con H_2O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , se evapora a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente AcOEt:hexano (1:1), obteniéndose 0.36 g (85%.) del producto **2.144** en forma de aceite viscoso. $[\alpha]_D = +9.4$ (*c* 0.95, $CHCl_3$). HPLC (Sunfire): $t_R = 7.14$ min (Gradiente de 20 a 100% A en 15 min). 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.19-7.05 (m, 10H, Ph), 3.55 (s, 3H, OMe), 3.47 (m, 1H, α -*H* Phe), 2.86 (d, 2H, $J = 6.9$, β -*H* Phe), 2.82-2.62 (m, 4H, 1'-*H*, 2'-*H*), 1.77 (s ancho, 1H, NH). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ 174.6 (CO), 139.4, 136.9, 128.8, 128.4, 128.2, 127.8, 126.2, 125.9 (*C* Ar), 62.8 (α -*C* Phe), 51.3 (OMe), 49.1 (1'-*C*), 39.3 (β -*C* Phe), 36.1 (2'-*C*). EM (ES modo positivo): 284.2 $[M+1]^+$. Anal. (%) Calc. para $C_{18}H_{21}NO_2$: C, 76.29; H, 7.47; N, 4.94. Anal. Exp. (%): C, 76.34; H, 7.21; N, 4.84.

2.6.1.2. Preparación de *N*-alquil-*N*-cloropropionil derivados de aminoácidos

Método A: A una disolución del correspondiente *N*-alquil derivado de α -aminoéster (5.78 mmol) en THF seco (28 ml) se añade óxido de propileno (87 mmol). Se enfría a 0 °C y se añade cloruro de 2-cloropropionilo (8.7 mmol). Tras dos horas de agitación a temperatura ambiente, se evapora el disolvente y se purifica el residuo resultante por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

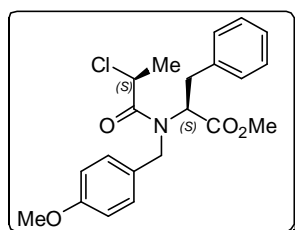
Método B: A una disolución del correspondiente *N*-alquil derivado de α -aminoéster (6.67 mmol) en DCM seco (28 ml) se le adiciona ácido 2(*S*)-cloropropiónico o 2(*R*)-cloropropiónico (13.34 mmol). A continuación se añade una disolución de PyBroP (13.34 mmol) y DIEA (12.01 mmol) en DCM seco (10 ml) y se deja reaccionar durante 12 h. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt y se lava con ácido cítrico (10%), NaHCO₃ (10%) y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se evapora a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

Método C: A una disolución del correspondiente *N*-alquil derivado de α -aminoéster (8.29 mmol) en THF seco (20 ml) se le añade ácido 2(*S*)-cloropropiónico (12.4 mmol), óxido de propileno (124.4 mmol) y tricloroacetnitrilo (16.6 mmol). A continuación se enfría a 0 °C con un baño de hielo y se añade lentamente trifenilfosfina soportada sobre polímero (5.2 g, 16.6 mmol) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. Pasado ese tiempo, la suspensión se filtra sobre celita, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt y se lava con ácido cítrico (10%), NaHCO₃ (10%) y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se evapora a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

Método D: A una disolución de ácido 2(*S*)-cloropropiónico (2.87 mmol) en THF seco (15 ml) se le añade tricloroacetnitrilo (3.8 mmol). A continuación se enfría a 0 °C con un baño de hielo y se añade lentamente trifenilfosfina (1 g, 3.8 mmol) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se adiciona la mezcla de

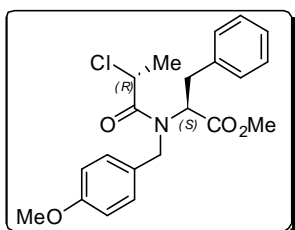
reacción a una disolución del correspondiente *N*-alquil derivado de α -aminoéster (1.92 mmol) y óxido de propileno (28.6 mmol) en THF seco (10 ml) a 0°C. Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 12 h. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt y se lava con ácido cítrico (10%), NaHCO₃ (10%) y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se evapora a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

***N*-[(*S*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-L-Phe-OMe (2.76a)**



Aceite viscoso. Rdto: 48% (*Método A*, a partir de **1.30**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:6). $[\alpha]_D = -93.7$ (*c* 0.9, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 11.85$ min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) Proporción de rotámeros (4:1) δ rotámero mayoritario 7.27–7.20 (m, 3H Ph), 7.11–7.08 (m, 2H, Ph), 7.00 (d, 2H, *J* = 8.7, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.80 (d, 2H, *J* = 8.7, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.53–4.45 (m, 2H, 2-*H* y N-CH₂), 4.39 (dd, 1H, *J* = 6.2, 9.1, α -*H* Phe), 3.98 (d, 1H, *J* = 16.1, N-CH₂), 3.79, 3.61 (s, 3H, OMe), 3.35 (dd, 1H, *J* = 6.2, 14.0, β -*H* Phe), 3.20 (dd, 1H, *J* = 9.1, 14.0, β -*H* Phe), 1.67 (d, 3H, *J* = 6.5, 2-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 170.2, 169.4 (CO), 159.2, 137.6, 129.2, 128.7, 128.5, 127.1, 126.7, 113.9 (C Ar), 60.2 (α -C Phe), 55.2, 52.0 (OMe), 51.2 (N-CH₂), 49.7 (2-C), 34.9 (β -C), 20.9 (2-CH₃). IR: 1742,8 CO éster; 1661,0 CO amida; 824,7 y 752,3 C-Cl. EM (ES modo positivo): 390.1 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₁H₂₄ClNO₄: C 64.69, H 6.20, N 3.59. Exp (%): C 64.53, H 6.45, N 3.31.

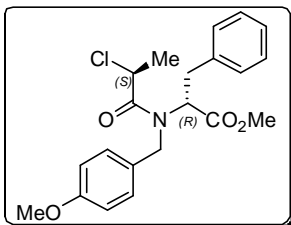
***N*-[(*R*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-L-Phe-OMe (2.76b)**



Aceite viscoso. Rdto: 42% (*Método A*, a partir de **1.30**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:6). $[\alpha]_D = +118.3$ (*c* 0.35, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 13.26$ min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (4.2:1) δ rotámero mayoritario 7.19–7.27 (m, 5H, Ph), 7.05 (d, 2H, *J* = 8.7, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.82 (d, 2H, *J* = 8.7, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.52 (d, 1H, *J* = 16.3, N-CH₂), 4.42 (c, 1H, *J* = 6.5, 2-*H*), 4.07 (dd, 1H, *J* = 5.1, 9.9, α -*H* Phe), 3.78, 3.71 (s, 3H, OMe),

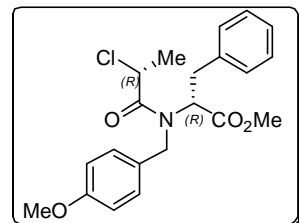
3.56 (d, 1H, $J = 16.3$, N-CH₂), 3.38 (dd, 1H, $J = 5.1, 13.9$, β -H Phe), 3.30 (dd, 1H, $J = 9.9$, 13.9, β -H Phe), 1.61 (d, 3H, $J = 6.5$, 2-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 170.1, 169.3 (CO), 159.2, 137.8, 129.6, 128.9, 128.6, 127.5, 126.7, 114.1 (C Ar), 62.4 (α -C Phe), 55.2, 52.4 (OMe), 52.2 (N-CH₂), 49.7 (2-C), 34.8 (β -C Phe), 20.8 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 390.1 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₁H₂₄ClNO₄: C 64.69, H 6.20, N 3.59. Exp (%): C 64.62, H 6.38, N 3.48.

***N*-[(*S*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-D-Phe-OMe (2.76c)**



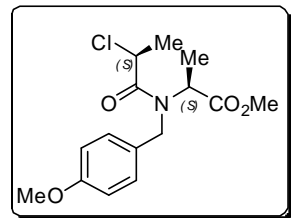
Aceite viscoso. Rdto: 40% (*Método A*, a partir de **2.75**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:6). [α]_D = -120.2 (*c* 1, CHCl₃). HPLC (Novapak): t_R = 13.20 min (A:B = 40:60). Anal (%) Calc. para C₂₁H₂₄ClNO₄: C 64.69, H 6.20, N 3.59. Exp (%): C 64.51, H 6.11, N 3.33. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN son idénticos a los de su enantiómero **2.76b**.

***N*-[(*R*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-D-Phe-OMe (2.76d)**



Aceite viscoso. Rdto: 52% (*Método A*, a partir de **2.75**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:6). [α]_D = +98.5 (*c* 1, CHCl₃). HPLC (Novapak): t_R = 11.82 min (A:B = 40:60). Anal (%) Calc. para C₂₁H₂₄ClNO₄: C 64.69, H 6.20, N 3.59. Exp (%): C 64.72, H 6.13, N 3.29. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN son idénticos a los de su enantiómero **2.76a**.

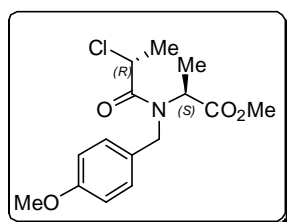
***N*-[(*S*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-L-Ala-OMe (2.81a)**



Aceite. Rdto: 53% (*Método B*, a partir de **2.78**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:2). [α]_D = -46.2 (*c* 0.5, CHCl₃). HPLC (Novapak): t_R = 12.03 min (A:B = 35:65). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (3.3:1) δ rotámero mayoritario 7.21 (d, 2H, $J = 8.7$, 2H y 6H Pmb), 6.90 (d, 2H, $J = 8.7$, 3H y 5H Pmb), 4.72 (d, 1H, $J = 17.1$, N-CH₂), 4.58-4.43 (m, 3H, N-CH₂, α -H Ala, 2-H), 3.81, 3.65 (s, 3H, OMe), 1.66 (d, 3H, $J = 6.6$, 2-CH₃), 1.38 (d, 3H, $J = 6.9$, β -H Ala). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 171.6, 169.6 (CO), 159.2,

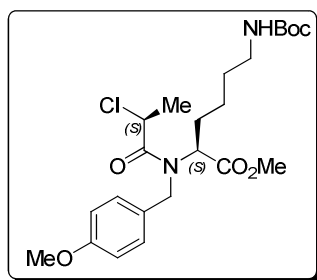
128.1, 127.9, 114.3 (C Ar), 55.3, 54.9 (OMe), 52.2 (α -C Ala), 50.3 (2-C), 50.6 (N-CH₂), 21.0 (β -C Ala), 14.6 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 314.1 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₁₅H₂₀ClNO₄: C 57.42, H 6.42, N 4.46. Exp (%): C 57.65, H 6.30, N 4.09.

N-[(R)-2-Cloropropionil]-N-p-metoxibencil-L-Ala-OMe (2.81b)



Aceite. Rdto: 50% (*Método B*, a partir **2.78**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:20). $[\alpha]_D = +14.5$ (*c* 0.45, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 14.48$ min (A:B = 35:65). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (3.2:1) δ rotámero mayoritario δ 7.20 (d, 2H, *J* = 8.6, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.90 (d, 2H, *J* = 8.6, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.83 (d, 1H, *J* = 17.3, N-CH₂), 4.68-4.41 (m, 3H, N-CH₂, α -*H* Ala, 2-*H*), 3.81, 3.72 (s, 3H, OMe), 1.61 (d, 3H, *J* = 6.6, 2-CH₃), 1.39 (d, 3H, *J* = 6.9, β -*H* Ala). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 171.4, 169.5 (CO), 159.1, 128.4, 127.3, 114.2 (C Ar), 55.1, 54.8 (OMe), 52.0 (α -C Ala), 50.0 (N-CH₂), 49.9 (2-C), 20.7 (β -C Ala), 14.1 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 314.0 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₁₅H₂₀ClNO₄: C 57.42, H 6.42, N 4.46. Exp (%): C 57.34, H 6.19, N 4.37.

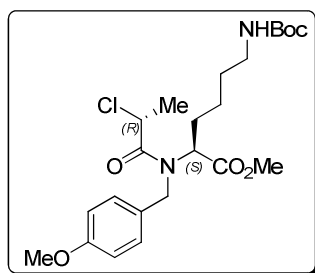
N-[(S)-2-Cloropropionil]-N-p-metoxibencil-L-Lys(Boc)-OMe (2.82a)



Aceite. Rdto: 70% (*Método B*, a partir de **2.79**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:4). $[\alpha]_D = -17.62$ (*c* 0.6, CHCl₃). HPLC (Deltapak): $t_R = 16.40$ min (A:B = 45:55). HPLC quiral: $t_R = 10.75$ min (EtOH:hexano = 7:93). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (2.8:1) δ rotámero mayoritario 7.14 (d, 2H, *J* = 8.5, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.5, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.86 (dd, *J* = 8.5, 6.5, 1H, α -*H* Lys), 4.71 (d, 1H, *J* = 16.8, N-CH₂), 4.49 (d, *J* = 16.8, 1H, N-CH₂), 4.48 (m, 2H, 2-*H* y ϵ -NH Lys), 3.80, 3.52 (s, 3H, OMe), 3.06 (m, 2H, ϵ -*H* Lys), 1.99 (m, 1H, β -*H* Lys), 1.81 (m, 1H, β -*H* Lys), 1.63 (d, 3H, *J* = 6.5, 2-CH₃), 1.44 (s, 9H, CH₃ ^tBu), 1.38 (m, 2H, δ -*H* Lys), 1.31 (m, 2H, γ -*H* Lys). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 171.1, 170.4 (CO), 159.2 (C-OMe), 155.9 (CO-Boc), 128.1, 127.8, 114.2 (C Ar), 79.0 (C-^tBu), 57.2 (α -C Lys), 55.3, 51.9 (OMe), 50.1 (2-C), 48.7 (N-CH₂), 40.2 (ϵ -C Lys), 29.5 (δ -C Lys), 29.0 (β -C Lys), 28.4

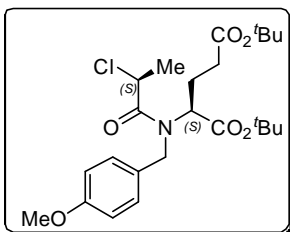
(CH₃-^tBu), 23.1 (γ -C Lys), 20.8 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 493.1 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₃H₃₅ClN₂O₆: C 58.65, H 7.49, N 5.95. Exp (%): C 58.57, H 7.52, N 5.82.

***N*-[(*R*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-L-Lys(Boc)-OMe (2.82b)**



Aceite. Rdto: 52% (*Método B*, a partir de **2.79**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:4). [α]_D = -34.33 (*c* 0.9, CHCl₃). HPLC (Deltapak): *t*_R = 18.56 min (A:B = 45:55). HPLC quiral: *t*_R = 8.37 min (EtOH:hexano = 7:93). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (2.4:1) δ rotámero mayoritario 7.23 (d, 2H, *J* = 8.8, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.90 (d, 2H, *J* = 8.8, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.83 (d, 1H, *J* = 17.1, N-CH₂), 4.52 (m, 2H, 2-*H* y ϵ -NH Lys), 4.44 (d, 1H, *J* = 17.1, N-CH₂), 4.28 (dd, 1H, *J* = 7.8, 6.6, α -*H* Lys), 3.82, 3.69 (s, 3H, OMe), 3.04 (m, 2H, ϵ -*H* Lys), 2.03 (m, 1H, β -*H* Lys), 1.85 (m, 1H, β -*H* Lys), 1.63 (d, 3H, *J* = 6.6, 2-CH₃), 1.44 (s, 9H, CH₃ ^tBu), 1.39 (m, 2H, δ -*H* Lys), 1.33 (m, 2H, γ -*H* Lys). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 171.0, 169.9 (CO), 159.3 (C-OMe), 155.9 (CO-Boc), 129.3, 127.9, 114.3 (C Ar), 78.8 (C ^tBu), 59.7 (α -C Lys), 55.3, 52.2 (OMe), 51.1 (N-CH₂), 49.9 (2-C), 40.1 (ϵ -C Lys), 29.7 (δ -C Lys), 28.6 (β -C Lys), 28.4 (CH₃ ^tBu), 23.9 (γ -C Lys), 20.7 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 493.1 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₃H₃₅ClN₂O₆: C 58.65, H 7.49, N 5.95. Exp (%): C 58.68, H 7.46, N 5.98.

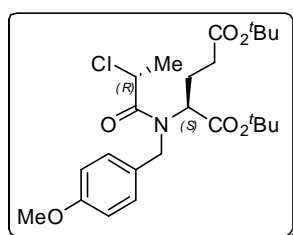
***N*-[(*S*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-L-Glu(O^tBu)-O^tBu (2.83a)**



Aceite viscoso. Rdto: 52% (*Método B*, a partir de **2.80**). Eluyente: AcOEt:CH₂Cl₂ (1:30). [α]_D = -37.1 (*c* 0.74, CHCl₃). HPLC (Novapak): *t*_R = 5.81 min (A:B = 40:60). HPLC quiral: *t*_R = 10.66 min (EtOH:hexano, 1:99). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (2.6:1) δ rotámero mayoritario 7.21 (d, 2H, *J* = 8.6, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.6, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.61 (s, 2H, N-CH₂), 4.53 (c, 1H, *J* = 6.5, 2-*H*), 4.28 (t, 1H, *J* = 6.8, α -*H* Glu), 3.80 (s, 3H, OMe), 2.31 (m, 1H, β -*H* Glu), 2.25 (m, 2H, γ -*H* Glu), 1.95 (m, 1H, β -*H* Glu), 1.63 (d,

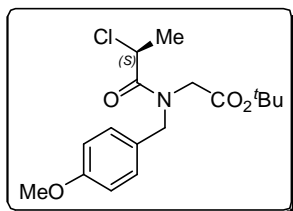
3H, $J = 6.5$, 2-CH₃), 1.41, 1.37 (s, 9H, CH₃ ^{*t*}Bu). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 172.2, 169.5, 169.0 (CO), 159.2, 128.4, 127.9, 114.1 (C Ar), 81.7, 80.3 (C ^{*t*}Bu), 58.7 (α -C Glu), 55.2 (OMe), 50.2 (N-CH₂), 49.9 (2-C), 32.0 (γ -C Glu), 27.9, 27.7 (CH₃ ^{*t*}Bu), 24.8 (β -C Glu), 20.9 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 470.13 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₄H₃₆ClNO₆: C 61.33, H 7.72, N 2.98. Exp (%): C 61.35, H 7.50, N 3.01.

***N*-[(*R*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-L-Glu(O^{*t*}Bu)-O^{*t*}Bu (2.83b)**



Aceite viscoso. Rdto: 65% (*Método B*, a partir de **2.80**). Eluyente: AcOEt:CH₂Cl₂ (1:30). $[\alpha]_D = -62.34$ (c 1.08, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 5.99$ min (A:B = 40:60). HPLC quiral: $t_R = 7.23$ min (EtOH:hexano 1:99). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (2.2:1) δ rotámero mayoritario δ 7.25 (d, 2H, $J = 8.7$, 2H y 6H Pmb), 6.88 (d, 2H, $J = 8.7$, 3H y 5H Pmb), 4.87 (d, 1H, $J = 17.1$, N-CH₂), 4.44 (c, 1H, $J = 6.5$, 2-H), 4.38 (d, 1H, $J = 17.1$, N-CH₂), 4.17 (t, 1H, $J = 6.1$, α -H Glu), 3.80 (s, 3H, OMe), 2.32 (m, 2H, γ -H Glu), 2.04 (m, 1H, β -H Glu), 1.97 (m, 1H, β -H Glu), 1.59 (d, 3H, $J = 6.6$, 2-CH₃), 1.44, 1.41 (s, 9H, CH₃ ^{*t*}Bu). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 172.3, 169.4, 168.9 (CO), 159.1, 129.3, 127.8, 114.2 (C Ar), 81.6, 80.4 (C ^{*t*}Bu), 59.9 (α -C Glu), 55.2 (OMe), 50.9 (N-CH₂), 49.7 (2-C), 32.0 (γ -C Glu), 28.0, 27.9 (CH₃ ^{*t*}Bu), 24.3 (β -C Glu), 20.7 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 470.26 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₄H₃₆ClNO₆: C 61.33, H 7.72, N 2.98. Exp (%): C 61.14, H 7.74, N 2.67.

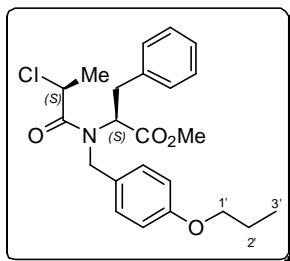
***N*-[(*S*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-Gly-O^{*t*}Bu (2.96)**



Aceite. Rdto: 32% (*Método C*, a partir de **2.95**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:12). $[\alpha]_D = +26.5$ (c 1, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 7.04$ min (A:B = 50:50). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): Proporción de rotámeros (1.2:1) δ rotámero mayoritario 7.09 (d, 2H, $J = 8.7$, 2H y 6H Pmb), 6.82 (d, 2H, $J = 8.7$, 3H y 5H Pmb), 4.67 (d, 1H, $J = 17.3$, N-CH₂), 4.60 (c, 1H, $J = 6.5$, 2-H), 4.51 (d, 1H, $J = 17.3$, N-CH₂), 3.90 (d, 1H, $J = 17.0$, α -H Gly), 3.79 (d, 1H, $J = 17.0$, α -H Gly), 3.74 (s, 3H, OMe), 1.69 (d, 3H, $J = 6.5$, 2-CH₃), 1.44 (s, 9H, CH₃ ^{*t*}Bu). ¹³C RMN (75

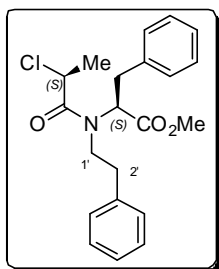
MHz, CDCl_3): δ rotámero mayoritario 169.5, 167.7 (CO), 159.3, 128.3, 127.3, 114.3 (C Ar), 81.7 (C^tBu), 55.3 (OMe), 51.4 (N- CH_2), 49.2 (2-C), 47.9 (α -C Gly), 28.1, 27.9 (CH_3^tBu), 20.9 (2- CH_3). EM (ES modo positivo): 364.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{ClNO}_4$: C 59.73, H 7.08, N 4.10. Exp (%): C 59.58, H 7.13, N 4.05.

***N*-[(*S*)-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-propoxibencil-L-Phe-OMe (2.140)**



Aceite. Rdto: 87% (*Método D*, a partir de **2.139**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:4). $[\alpha]_D = -82.9$ (c 0.79, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 7.63$ min (Gradiente de 20 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): Proporción de rotámeros (3:1) δ rotámero mayoritario 7.29-7.07 (m, 5H, Ph), 6.98 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Ar), 6.79 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Ar), 4.49 (d, 1H, $J = 15.7$, N- CH_2), 4.48 (c, 1H, $J = 6.4$, 2-*H*), 4.39 (dd, 1H, $J = 6.2$, 8.9, α -*H* Phe), 3.99 (d, 1H, $J = 15.7$, N- CH_2), 3.89 (t, 2H, $J = 7.1$, 1'-*H*), 3.60 (s, 3H, OMe), 3.35 (dd, 1H, $J = 6.2$, 14.2, β -*H* Phe), 3.20 (dd, 1H, $J = 8.9$, 14.2, β -*H* Phe), 1.80 (m, 2H, 2'-*H*), 1.67 (d, 3H, $J = 6.4$, 2- CH_3), 1.03 (t, 3H, $J = 7.5$, 3'-*H*). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ rotámero mayoritario 170.3, 169.5 (CO), 158.8, 137.6, 132.9, 130.3, 129.3, 128.7, 127.2, 114.6 (C Ar), 69.5 (1'-C), 60.2 (α -C Phe), 52.1 (OMe), 51.3 (N- CH_2), 49.8 (2-C), 35.0 (β -C Phe), 22.9 (2'-C), 22.5 (2- CH_3), 10.5 (3'-C). EM (ES modo positivo): 440.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. (%) Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClNO}_4$: C, 66.10; H, 6.75; N, 3.35. Anal. Exp. (%): C, 66.23; H, 6.68; N, 3.29.

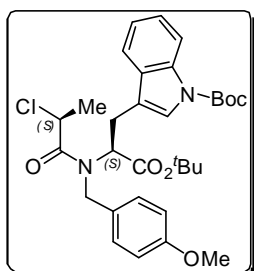
***N*-[(*S*)-2-Cloropropionil]-*N*-fenetil-L-Phe-OMe (2.145)**



Aceite viscoso. Rdto: 85% (*Método D*, a partir de **2.144**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:8). $[\alpha]_D = -92.4$ (c 0.89, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 5.98$ min (Gradiente de 50 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): proporción de rotámeros (4:1) δ rotámero mayoritario 7.31-7.03 (m, 10H, Ph), 4.31 (c, 1H, $J = 6.6$, 2-*H*), 4.28 (m, 1H, α -*H* Phe), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.47-3.29 (m, 3H, β -*H* Phe, 1'-*H*), 3.08 (m, 1H, 1'-*H*), 2.64 (m, 2H, 2'-*H*), 1.60 (d, 3H, $J = 6.6$, 2- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ rotámero mayoritario 170.5, 169.1 (CO), 137.8, 129.2, 129.0, 128.7, 128.6, 128.5, 127.4, 126.7 (C Ar), 62.6 (α -C Phe), 52.4 (OMe), 51.1 (1'-C), 49.5 (2-C),

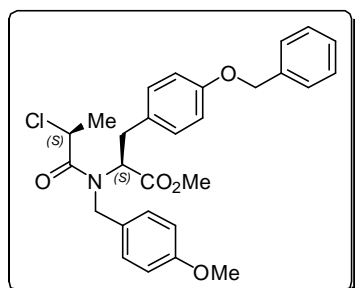
35.1 (β -C Phe), 34.4 (2'-C), 21.0 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 374.2 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₁H₂₄ClNO₃: C, 67.46; H, 6.47; N, 3.75. Anal. Exp. (%): C, 67.23; H, 6.39; N, 3.77.

N-[(S)-2-Cloropropionil]-N-p-metoxibencil-L-Trp(Boc)-O^tBu (2.154)



Aceite. Rdto: 68% (*Método D*, a partir de **2.151**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:7). $[\alpha]_D = -69.5$ (*c* 0.66, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 14.29$ min (Gradiente de 15 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): proporción de rotámeros (3.8:1) δ rotámero mayoritario 8.11 (d ancho, 1H, *J* = 8.5, 4-*H* indol), 7.30 (m, 2H, 7-*H*, 2-*H* indol), 7.24 (m, 1H, 5-*H* indol), 7.17 (m, 1H, 6-*H* indol), 6.83 (d, 2H, *J* = 8.7, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.37 (d, 2H, *J* = 8.7, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 4.50 (c, 1H, *J* = 6.5, 2-*H*), 4.37 (d, 1H, *J* = 16.0, N-CH₂), 4.08 (m, 1H, α -*H* Trp), 4.07 (d, 1H, *J* = 16.0, N-CH₂), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.42 (dd, 1H, *J* = 9.3, 14.9, β -*H* Trp), 3.14 (dd, 1H, *J* = 6.0, 14.9, β -*H* Trp), 1.72 (d, 3H, *J* = 6.5, 2-CH₃), 1.66, 1.43 (s, 9H, CH₃-^tBu). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 168.9, 168.8 (CO), 159.1 (C-OMe), 149.5 (CO-Boc), 135.4, 130.5, 129.0, 127.0, 124.4, 124.1, 122.4, 118.7, 116.9, 115.2, 113.6 (C Ar), 83.4, 81.9 (C-^tBu), 60.6 (α -C Trp), 55.1 (OMe), 52.3 (NCH₂), 49.9 (2-C), 28.2, 27.9 (CH₃-^tBu), 24.0 (β -C Trp), 21.1 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 572.1 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₃₁H₃₉ClN₂O₆: C, 65.20; H, 6.88; N, 4.91. Anal. Exp. (%): C, 65.02; H, 6.58; N, 5.02.

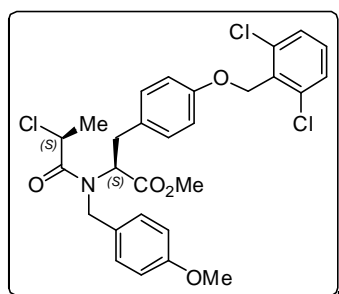
N-[(S)-2-Cloropropionil]-N-p-metoxibencil-L-Tyr(Bzl)-OMe (2.155)



Aceite. Rdto: 88% (*Método D*, a partir de **2.152**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:7). $[\alpha]_D = -55.3$ (*c* 1.04, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 12.33$ min (Gradiente de 10 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): proporción de rotámeros (2.5:1) δ rotámero mayoritario 7.45-7.32 (m, 5H, Ph), 7.00 (d, 2H, *J* = 8.7, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.98 (d, 2H, *J* = 8.9, 2-*H* y 6-*H* Ar Tyr), 6.87 (d, 2H, *J* = 8.9, 3-*H* y 5-*H* Ar Tyr), 6.80 (d, 2H, *J* = 8.7, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 5.06 (s ancho, 2H, OCH₂), 4.50 (d, 1H, *J* = 16.1, N-CH₂), 4.47 (m, 1H, 2-*H*), 4.35 (dd, 1H, *J* = 6.2, 9.0, α -*H*

Tyr), 4.01 (d, 1H, $J = 16.1$, N-CH₂), 3.79, 3.60 (s, 3H, OMe), 3.28 (dd, 1H, $J = 6.2$, 14.1, β -H Tyr), 3.14 (dd, 1H, $J = 9.0$, 14.1, β -H Tyr), 1.67 (d, 3H, $J = 6.5$, 2-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 170.3, 169.4 (CO), 159.2, 157.6, 136.9, 133.1, 130.2, 129.8, 128.7, 128.5, 127.9, 127.4, 114.9, 114.0 (C Ar), 70.0 (OCH₂), 60.3 (α -C Tyr), 55.2, 52.0 (OMe), 51.2 (NCH₂), 49.8 (2-C), 34.1 (β -C Tyr), 21.0 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 496.8 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para : C₂₈H₃₀ClNO₅: C, 67.80; H, 6.10; N, 2.82. Anal. Exp. (%): C, 67.87; H, 6.04; N, 2.79.

***N*-[*(S)*-2-Cloropropionil]-*N*-*p*-metoxibencil-*L*-Tyr(2,4-diclorobencil)-OMe (2.156)**

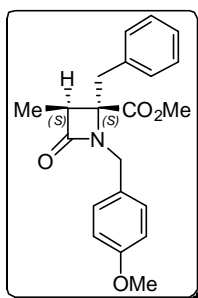


Sólido céreo. Rdto: 93% (*Método D*, a partir de **2.153**). Eluyente: gradiente de 12 a 16 % de AcOEt en hexano. $[\alpha]_D = -46.4$ (c 1.01, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 13.13$ min (Gradiente de 19 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): proporción de rotámeros (3.3:1) δ rotámero mayoritario 7.42-7.30 (m, 1H, Cl₂C₆H₃), 7.07 (d, 2H, $J = 8.4$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 7.04 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Ar Tyr), 6.97 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Ar Tyr), 6.88 (d, 2H, $J = 8.4$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 5.30 (s ancho, 2H, OCH₂), 4.54 (d, 1H, $J = 16.2$, N-CH₂), 4.53 (m, 1H, 2-*H*), 4.40 (dd, 1H, $J = 6.2$, 8.9, α -H Tyr), 4.13 (d, 1H, $J = 16.2$, N-CH₂), 3.83, 3.66 (s, 3H, OMe), 3.35 (dd, 1H, $J = 6.2$, 14.1, β -H Tyr), 3.21 (dd, 1H, $J = 8.9$, 14.1, β -H Tyr), 1.72 (d, 3H, $J = 6.5$, 2-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ rotámero mayoritario 170.3, 169.5 (CO), 159.2, 157.7, 136.9, 132.1, 130.4, 130.3, 130.2, 128.7, 128.4, 127.2, 115.1, 114.0 (C Ar), 75.3 (OCH₂), 60.4 (α -C Tyr), 55.3, 52.1 (OMe), 51.3 (NCH₂), 49.8 (2-C), 34.1 (β -C Tyr), 21.1 (2-CH₃). EM (ES modo positivo): 565.8 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₈H₂₈Cl₃NO₅: C, 59.53; H, 5.00; N, 2.48. Anal. Exp. (%): C, 59.66; H, 5.02; N, 2.23.

2.6.1.3. Ciclación a las 2-azetidinonas

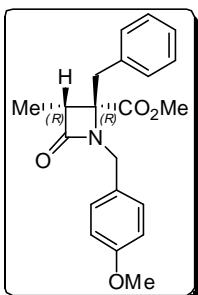
A una disolución del correspondiente *N*-alquil-*N*-cloropropionil derivado de aminoácido (1 mmol) en MeCN seco (12 ml) se añade Cs₂CO₃ (2 mmol) o BTPP (1.5 mmol) y se agita a temperatura ambiente hasta la desaparición del producto de partida. Se evapora el disolvente a sequedad y el residuo resultante se disuelve en AcOEt:H₂O (1:1). Se separan las fases y el extracto orgánico se lava con disolución saturada de NaCl y se seca sobre Na₂SO₄. Se elimina el disolvente y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

(3*S*,4*S*)-4-Bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (**2.77a**)



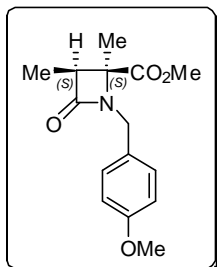
Aceite. Rdto: 70% y 64% (a partir de **2.76a** y **2.76c**, respectivamente). Eluyente: AcOEt:hexano (1:5 a 1:3). $[\alpha]_D = -6.6$ (c 1, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 10.72$ min (A:B = 40:60). HPLC quiral: $t_R = 12.49$ min (EtOH:hexano, 5:95). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.22-7.19 (m, 3H, Ph), 7.14 (d, 2H, *J* = 8.6, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.96-6.93 (m, 2H, Ph), 6.83 (d, 2H, *J* = 8.6, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.40 (d, 1H, *J* = 15.3, 1-CH₂), 4.13 (d, 1H, *J* = 15.3, 1-CH₂), 3.80, 3.71 (s, 3H, OMe), 3.33 (d, 1H, *J* = 14.5, 4-CH₂), 3.15 (c, 1H, *J* = 7.6, 3-*H*), 3.10 (d, 1H, *J* = 14.5, 4-CH₂), 1.14 (d, 3H, *J* = 7.6, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 171.7, 169.6 (CO), 158.8, 135.0, 129.9, 129.4, 128.9, 128.4, 127.1, 113.7 (C Ar), 68.9 (4-C), 55.2, 53.5 (OMe), 51.2 (3-C), 45.4 (1-CH₂), 40.4 (4-CH₂), 10.0 (3-CH₃). IR: 1757,0 CO éster y β -lactama. EM (ES modo positivo): 354.1 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₁H₂₃NO₄: C 71.37, H 6.56, N 3.96. Exp (%): C 71.55, H 6.44, N 4.01.

(3*R*,4*R*)-4-Bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (**2.77d**)



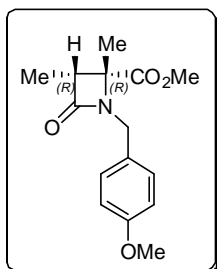
Aceite. Rdto: 66% y 69% (a partir de **2.76b** y **2.76d**, respectivamente). Eluyente: AcOEt:hexano (1:5 a 1:3). $[\alpha]_D = +6.7$ (c 1, CHCl₃). HPLC quiral: $t_R = 11.44$ min (EtOH:hexano, 5:95). Anal (%) Calc. para C₂₁H₂₃NO₄: C 71.37, H 6.56, N 3.96. Exp (%): C 71.42, H 6.38, N 4.00. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN son idénticos a los de su enantiómero **2.77a**.

(3S,4S)-3,4-Dimetil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (2.84a)



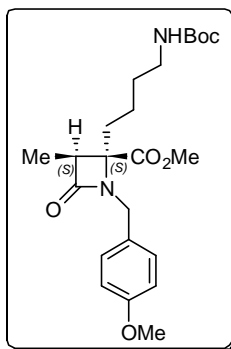
Aceite viscoso. Rdto: 66% (a partir de **2.81a**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:3 a 1:2). $[\alpha]_D = -49.6$ (*c* 0.5, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 5.87$ min (A:B = 35:65). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.22 (d, 2H, *J* = 8.7, 2H y 6H Pmb), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.7, 3H y 5H Pmb), 4.71 (d, 1H, *J* = 15.0, 1-CH₂), 4.12 (d, 1H, *J* = 15.0, 1-CH₂), 3.79, 3.73 (s, 3H, OMe), 3.04 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-H), 1.28 (s, 3H, 4-CH₃), 1.16 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 171.8, 168.5 (CO), 158.9, 129.7, 127.9, 113.7 (C Ar), 64.5 (4-C), 56.2, 54.9 (OMe), 51.8 (3-C), 43.9 (N-CH₂), 21.2 (4-CH₃), 9.7 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 278.0 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₁₅H₁₉NO₄: C 64.97, H 6.91, N 5.05. Exp (%): C 65.43, H 6.73, N 4.90.

(3R,4R)-3,4-Dimetil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (2.84d)



Aceite viscoso. Rdto: 54% (a partir de **2.81b**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:3 a 1:2). $[\alpha]_D = +48.8$ (*c* 0.5, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 5.80$ min (A:B = 35:65). Anal (%) Calc. para C₁₅H₁₉NO₄: C 64.97, H 6.91, N 5.05. Exp (%): C 65.30, H 6.98, N 5.14. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN son idénticos a los de su enantiómero **2.84a**.

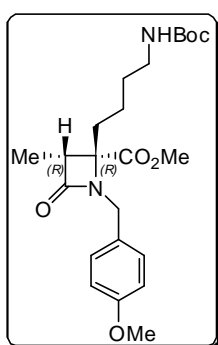
(3S,4S)-4-(4'-*tert*-Butoxycarbonilamino)butil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (2.85a)



Aceite. Rdto: 67% (a partir de **2.82a**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:4 a 1:3). $[\alpha]_D = -17.4$ (*c* 1.2, CHCl₃). HPLC (DeltaPak): $t_R = 5.41$ min (A:B = 45:55). HPLC quiral: $t_R = 12.30$ min (EtOH:hexano, 7:93). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.22 (d, 2H, *J* = 8.7, 2H y 6H Pmb), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.7, 3H y 5H Pmb), 4.77 (d, 1H, *J* = 15.4, 1-CH₂), 4.31 (m, 1H, 4'-NH), 4.11 (d, 1H, *J* = 15.4, 1-CH₂), 3.79, 3.46 (s, 3H, OMe), 3.14 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-H), 2.88 (m, 2H, 4'-H), 1.72 (m, 2H, 1'-H), 1.44 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.16 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃), 1.11 (m, 3H, 2'-H y 3'-H), 0.99 (m, 1H, 2'-H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 171.8, 169.3 (CO), 159.1 (C-OMe), 155.8 (CO-Boc), 129.7, 128.8,

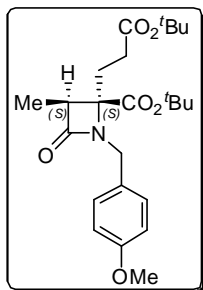
113.9 (C Ar), 79.1 (C ^tBu), 68.6 (4-C), 55.2 (OMe), 52.9 (3-C), 52.0 (OMe), 44.5 (1-CH₂), 39.9 (4'-C), 34.1 (1'-C), 29.9 (3'-C), 28.4 (CH₃ ^tBu), 21.3 (2'-C), 10.1 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 457.1 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₃H₃₄N₂O₆: C 63.57, H 7.89, N 6.45. Exp (%): C 63.61, H 7.86, N 6.48.

(3R,4R)-4-(4'-*tert*-Butoxicarbonilamino)butil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (2.85d)



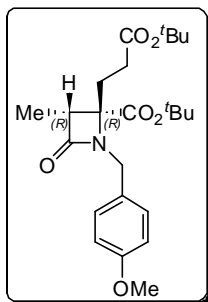
Aceite. Rdto: 77%. (a partir de **2.82b**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:4 a 1:3). [α]_D = +15.2 (c 1.2, CHCl₃). HPLC (DeltaPak): *t*_R = 5.41 min (A:B = 45:55). HPLC quiral: *t*_R = 16.22 min (EtOH:hexano, 7:93). EM (ES modo positivo): 457.1 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₃H₃₄N₂O₆: C 63.57, H 7.89, N 6.45, Exp (%): C 63.62, H 7.69, N 6.41. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN son idénticos a los de su enantiómero **2.85a**.

(3S,4S)-4-*tert*-Butoxicarbonil-4-(2-*tert*-butoxicarbonil)etil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.86a)



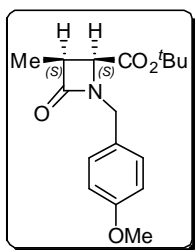
Aceite. Rdto: 48% (a partir de **2.83a**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:5). [α]_D = -23.70 (c 0.9, CHCl₃). HPLC (Novapak): *t*_R = 6.01 min (A:B = 40:60). HPLC quiral: *t*_R = 11.39 min (EtOH:hexano 2:98). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.24 (d, 2H, *J* = 8.8, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.8, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.87 (d, 1H, *J* = 15.4, 1-CH₂), 4.09 (d, 1H, *J* = 15.4, 1-CH₂), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.08 (c, 1H, *J* = 7.6, 3-*H*), 1.96 (m, 4H, 1'-*H* y 2'-*H*), 1.49, 1.35 (s, 9H, CH₃ ^tBu), 1.22 (d, 3H, *J* = 7.6, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 171.5, 169.9, 169.3 (CO), 159.0, 129.7, 128.5, 113.9 (C Ar), 82.9, 80.4 (C ^tBu), 67.3 (4-C), 55.1 (OMe), 52.7 (3-C), 44.3 (1-CH₂), 29.9 (2'-C), 29.5 (1'-C), 28.1, 27.9 (CH₃ ^tBu), 10.4 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 434.13 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₄H₃₅NO₆: C 66.49, H 8.14, N 3.23. Exp (%): C 66.25, H 8.27, N 3.05.

(3R,4R)-4-*tert*-Butoxicarbonil-4-(2-*tert*-butoxicarbonil)etil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.86d)



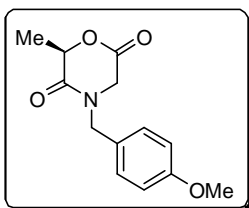
Aceite. Rdto: 54% (a partir de **2.83b**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:9 a 1:5). $[\alpha]_D = +19.79$ (*c* 1, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 6.01$ min, (A:B = 40:60). HPLC quiral: $t_R = 21.65$ min, (EtOH/Hexano 2:98). EM (ES modo positivo): 434.13 $[M+1]^+$. Anal (%) Calc. para C₂₄H₃₅NO₆: C 66.49, H 8.14, N 3.23. Exp (%): C 66.57, H 8.02, N 3.24. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN son idénticos a los de su enantiómero **2.86a**.

(3S,4S)-4-*tert*-Butoxicarbonil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.97)



Aceite. Rdto: 22% (a partir de **2.96**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:12 a 1:7). $[\alpha]_D = -25.5$ (*c* 1, CHCl₃). HPLC (Novapak): $t_R = 8.56$ min (A:B = 40:60). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.14 (d, 2H, *J* = 8.7, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.7, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.77 (d, 1H, *J* = 14.6, 1-CH₂), 4.05 (d, 1H, *J* = 14.6, 1-CH₂), 3.84 (d, 1H, *J* = 5.6, 4-*H*), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.40 (m, 1H, 3-*H*), 1.47 (s, 9H, CH₃ *t*Bu), 1.23 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 169.3, 168.7 (CO), 158.2, 129.8, 127.0, 114.1 (C Ar), 82.5 (C *t*Bu), 55.1 (OMe), 53.4 (4-C), 48.1 (3-C), 44.3 (1-CH₂), 28.1 (CH₃ *t*Bu), 9.9 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 328.0 $[M+Na]^+$. Anal (%) Calc. para C₁₇H₂₃NO₄: C 66.86, H 7.59, N 4.59. Exp (%): C 66.78, H 7.74, N 4.86.

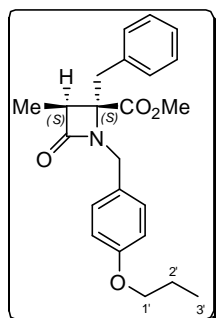
6-(*R*)-Metil-4-*p*-metoxibencil-2,5-dioxomorfolina (2.98)



Aceite viscoso. Rdto: 8% (Producto secundario obtenido partir de **2.96**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:12 a 1:7). HPLC (Novapak): $t_R = 4.11$ min (A:B = 30:70). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.11 (d, 2H, *J* = 8.7, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.81 (d, 2H, *J* = 8.7, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.85 (c, 1H, *J* = 7.2, 6-*H*), 4.51 (d, 2H, *J* = 14.4, 4-CH₂), 4.44 (d, 2H, *J* = 14.4, 4-CH₂), 3.96 (d, 1H, *J* = 14.8, 3-*H*), 3.88 (d, 1H, *J* = 14.8, 3-*H*), 3.74 (s, 3H, OMe), 1.58 (d, 3H, *J* = 7.2, 6-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.1, 165.2 (CO), 159.6, 129.7, 126.5, 114.4 (C Ar), 75.0 (6-C), 55.3 (OMe), 48.9 (4-CH₂), 47.1 (3-C), 17.4

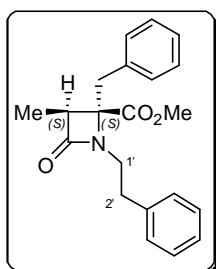
(6-CH₃). EM (ES modo positivo): 250.1 [M+1]⁺, 272.0 [M+Na]⁺. Anal (%) Calc. para C₁₃H₁₅NO₄: C 62.64, H 6.07, N 5.62. Exp (%): C 62.88, H 6.34, N 5.35

(3S,4S)-4-Bencil-3-metil-4-metoxicarbonil-1-p-propoxibencil-2-azetidinona (2.141)



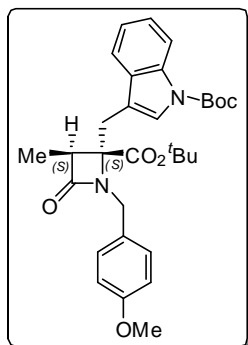
Aceite viscoso. Rdto: 70%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:2). [α]_D = -1.26 (c 1.05, CHCl₃). HPLC (Sunfire): *t*_R = 5.90 min (Gradiente de 50 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.20 (m, 3H, Ph), 7.13 (d, 2H, *J* = 8.5, 2-*H* y 6-*H* Ar), 6.94 (m, 2H, Ph), 6.82 (d, 2H, *J* = 8.5, 3-*H* y 5-*H* Ar), 4.41 (d, 1H, *J* = 15.3, 1-CH₂), 4.12 (d, 1H, *J* = 15.3, 1-CH₂), 3.90 (t, 2H, *J* = 6.9, 1'-*H*), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.31 (d, 1H, *J* = 14.4, 4-CH₂), 3.15 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-*H*), 3.10 (d, 1H, *J* = 14.4, 4-CH₂), 1.79 (m, 2H, 2'-*H*), 1.14 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃), 1.03 (t, 3H, *J* = 7.4, 3'-*H*). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 171.6, 169.6 (CO), 158.4, 135.0, 129.9, 129.7, 128.6, 128.4, 127.1, 114.3 (C Ar), 69.4 (1'-C), 68.9 (4-C), 53.4 (3-C), 52.0 (OMe), 45.4 (1-CH₂), 40.3 (4-CH₂), 22.5 (2'-C), 10.4 (3'-C), 10.0 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 382.3 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₃H₂₇NO₄: C 72.42, H 7.13, N 3.67. Exp (%): C 72.51, H 7.03, N 3.58.

(3S,4S)-4-Bencil-1-fenetil-3-metil-4-metoxicarbonil-2-azetidinona (2.146)



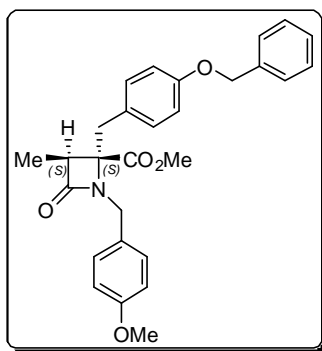
Aceite viscoso. Rdto: 75%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:4). [α]_D = -21.9 (c 0.93, CHCl₃). HPLC (Sunfire): *t*_R = 4.34 min (Gradiente de 50 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.30-7.07 (m, 10H, Ph), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.51 (d, 1H, *J* = 14.3, 4-CH₂), 3.23 (m, 1H, 1'-*H*), 3.16-2.93 (m, 4H, 1'-*H*, 2'-*H*, 3-*H*), 3.08 (d, 1H, *J* = 14.3, 4-CH₂), 1.17 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 171.8, 169.5 (CO), 138.9, 135.1, 129.7, 128.7, 128.6, 128.4, 127.4, 126.3 (C Ar), 68.9 (4-C), 53.8 (3-C), 52.2 (OMe), 44.9 (1'-C), 40.8 (4-CH₂), 34.4 (2'-C), 10.2 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 338.3 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₁H₂₃NO₃: C, 74.75; H, 6.87; N, 4.15. Anal. Exp. (%): C, 74.86; H, 6.68; N, 4.00.

(3*S*,4*S*)-4-*tert*-Butoxicarbonil-4-[(*N*-*tert*-butoxicarbonil)indol-3-il]metil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.157)



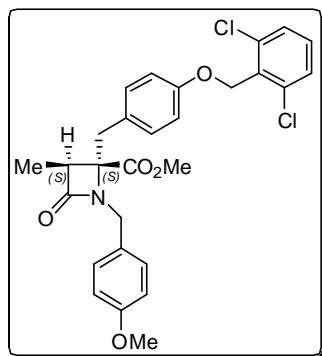
Aceite viscoso. Rdto: 58%. Eluyente: gradiente de 17 a 33 % de AcOEt en hexano. $[\alpha]_D = -3.7$ (c 1.01, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 13.82$ min (Gradiente de 20 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 8.07 (m, 1H, 4-*H* indol), 7.28 (m, 2H, 7-*H*, 2-*H* indol), 7.17 (m, 1H, 5-*H* indol), 7.13 (m, 1H, 6-*H* indol), 7.07 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.69 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 4.60 (d, 1H, $J = 15.2$, 1- CH_2), 4.11 (d, 1H, $J = 15.2$, 1- CH_2), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.23-3.11 (m, 3H, 3-*H* y 4- CH_2), 1.66, 1.50 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu), 1.23 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): 170.5, 169.8 (CO), 158.7 (C-OMe), 149.4 (CO-Boc), 134.9, 130.9, 129.5, 128.6, 124.4, 123.9, 122.5, 118.3, 115.1, 114.3, 113.7 (C Ar), 85.6, 83.1 (C-*t*Bu), 68.2 (4-C), 55.1 (OMe), 53.9 (3-C), 45.0 (1- CH_2), 29.6 (4- CH_2), 28.2, 28.1 (CH_3 -*t*Bu), 10.3 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 535.6 $[\text{M}+1]^+$. Anal. (%) Calc. para $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 69.64; H, 7.16; N, 5.24. Anal. Exp. (%): C, 69.31; H, 7.05; N, 5.29.

(3*S*,4*S*)-4-*p*-Benciloxibencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxicarbonil-2-azetidinona (2.158)



Aceite. Rdto: 73%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:5). $[\alpha]_D = -55.3$ (c 1.04, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 11.63$ min (Gradiente de 10 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 7.44-7.30 (m, 7H, Ar), 6.86-6.76 (m, 6H, Ar), 5.02 (s ancho, 2H, OCH_2), 4.41 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 4.11 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 3.79, 3.70 (s, 3H, OMe), 3.27 (d, 1H, $J = 14.5$, 4- CH_2), 3.14 (c, 1H, $J = 7.5$, 3-*H*), 3.03 (d, 1H, $J = 14.5$, 4- CH_2), 1.14 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): 171.8, 169.7 (CO), 158.8, 157.9, 136.9, 131.0, 129.8, 129.0, 128.6, 127.9, 127.4, 127.3, 114.8, 113.7 (C Ar), 70.0 (OCH_2), 69.1 (4-C), 55.2 (OMe), 53.4 (3-C), 52.0 (OMe), 45.5 (1- CH_2), 39.6 (4- CH_2), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 460.5 $[\text{M}+1]^+$. Anal. (%) Calc. para : $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_5$: C, 73.18; H, 6.36; N, 3.05. Anal. Exp. (%): C, 73.22; H, 6.42; N, 2.71.

(3*S*,4*S*)-4-*p*-(2,6-Diclorobenciloxi)bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxicarbonil-2-azetidinona (2.159)

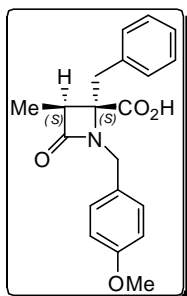


Aceite viscoso. Rdto: 89%. Eluyente: gradiente de 17 a 33 % de AcOEt en hexano. $[\alpha]_D = -5.5$ (c 1.05, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 12.46$ min (Gradiente de 10 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.38-7.25 (m, 3H, Cl₂C₆H₃), 7.15-6.81 (m, 8H, Ar), 5.22 (s ancho, 2H, OCH₂), 4.44 (d, 1H, $J = 15.4$, 1-CH₂), 4.13 (d, 1H, $J = 15.4$, 1-CH₂), 3.80, 3.72 (s, 3H, OMe), 3.29 (d, 1H, $J = 14.5$, 4-CH₂), 3.06 (d, 1H, $J = 14.5$, 4-CH₂), 3.16 (c, 1H, $J = 7.5$, 3-H), 1.15 (d, 3H, $J = 7.5$, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 171.8, 169.7 (CO), 158.9, 157.9, 137.0, 132.0, 131.0, 130.4, 129.8, 129.0, 128.5, 127.7, 114.9, 113.7 (C Ar), 69.2 (OCH₂), 65.2 (4-C), 55.3 (OMe), 53.4 (3-C), 52.1 (OMe), 45.5 (1-CH₂), 39.6 (4-CH₂), 10.0 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 529.4 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₈H₂₇Cl₂NO₅: C, 63.64; H, 5.15; N, 2.65. Anal. Exp. (%): C, 63.31; H, 5.23; N, 2.58.

2.6.2. Procedimiento general para las reacciones de saponificación

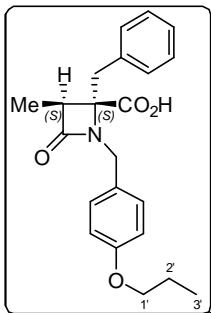
A una disolución de la correspondiente β -lactama (0.45 mmol) en MeOH (10 ml) se le adiciona NaOH 2N (0.46 ml, 1.12 mmol). Tras 15h de reacción, se evapora el MeOH a sequedad. El residuo resultante se disuelve en agua, se acidifica a pH 3 y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre Na_2SO_4 y se evapora a sequedad, obteniéndose los productos deseados.

(3*S*,4*S*)-4-Bencil-4-carboxi-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.87)



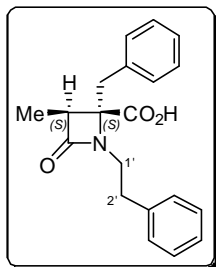
Sólido. Rdto: 84%. P.f.: 148-150 °C. $[\alpha]_D = +16.2$ (c, 1.05, MeOH). HPLC (Novapak): $t_R = 9.04$ min (A:B = 35:65). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.29-6.77 (m, 9H, Ar), 4.53 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 4.06 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.30 (d, 1H, $J = 14.5$, 4- CH_2), 3.18 (c, 1H, $J = 7.4$, 3- H), 3.10 (d, 1H, $J = 14.5$, 4- CH_2), 1.22 (d, 3H, $J = 7.4$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 174.9, 163.7 (CO), 159.6, 134.8, 130.1, 129.9, 128.7, 128.5, 127.2, 114.4, 113.8 (C Ar), 68.9 (4-C), 55.3 (OMe), 53.2 (3-C), 45.7 (1- CH_2), 40.1 (4- CH_2), 10.2 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 340.1 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: C 70.78, H 6.24, N 4.13. Exp (%): C 79.91, H 6.32, N 4.02.

(3*S*,4*S*)-4-Bencil-4-carboxi-3-metil-1-*p*-propoxibencil-2-azetidinona (2.138f)



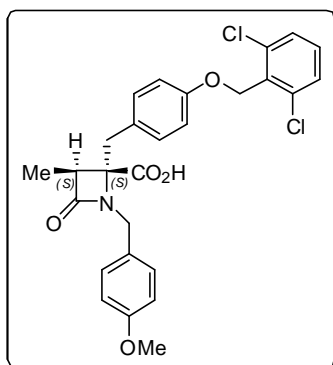
Sólido céreo. Rdto: 83%. $[\alpha]_D = +15.9$ (c 0.90, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 9.87$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 9.14 (s ancho, 1H, CO_2H), 7.17 (m, 3H, Ph), 7.16 (d, 2H, $J = 8.7$, 2- H y 6- H Ar), 6.92 (m, 2H, Ph), 6.83 (d, 2H, $J = 8.7$, 3- H y 5- H Ar), 4.57 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 4.06 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 3.90 (t, 2H, $J = 6.9$, 1'- H), 3.30 (d, 1H, $J = 14.3$, 4- CH_2), 3.21 (c, 1H, $J = 7.3$, 3- H), 3.11 (d, 1H, $J = 14.3$, 4- CH_2), 1.79 (m, 2H, 2'- H), 1.24 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3), 1.03 (t, 3H, $J = 7.4$, 3'- H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.1, 170.6 (CO), 158.5, 134.7, 129.9, 129.8, 128.4, 128.3, 127.2, 114.4 (C Ar), 69.5 (1'-C), 69.1 (4-C), 52.9 (3-C), 45.8 (1- CH_2), 40.1 (4- CH_2), 22.5 (2'-C), 10.5 (3'-C), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 368.3 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_4$: C 71.91, H 6.86, N 3.81. Exp (%): C 71.83, H 6.92, N 3.78.

(3*S*,4*S*)-4-Bencil-4-carboxi-1-fenetil-3-metil-2-azetidinona (2.138j)



Sólido. Rdto: 95%. P.f.: 110-112 °C. $[\alpha]_D = -10.7$ (*c* 0.97, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 9.23$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.47 (s ancho, 1H, CO₂H), 7.27-7.04 (m, 10H, Ph), 3.51 (d, 1H, *J* = 14.3, 4-CH₂), 3.31-2.92 (m, 5H, 1'-H, 2'-H, 3-H), 3.10 (d, 1H, *J* = 14.3, 4-CH₂), 1.25 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 175.2, 170.4 (CO), 138.9, 134.9, 129.8, 128.7, 128.6, 128.4, 127.5, 126.4 (C Ar), 68.8 (4-C), 53.4 (3-C), 45.1 (1'-C), 40.5 (4-CH₂), 34.3 (2'-C), 10.2 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 324.2 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₀H₂₁NO₃: C, 74.28; H, 6.55; N, 4.33. Anal. Exp. (%): C, 74.23; H, 6.61; N, 4.28.

(3*S*,4*S*)-4-Carboxi-4-*p*-(2,6-diclorobenciloxi)bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.160)

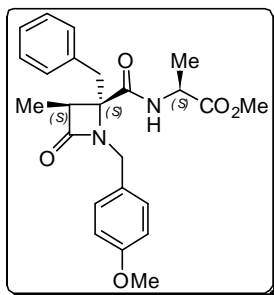


Aceite. Rdto: 91%. $[\alpha]_D = +8.3$ (*c* 1.03, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.35$ min (Gradiente de 15 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.37-7.25 (m, 3H, Cl₂C₆H₃), 7.18 (d, 2H, *J* = 8.6, 2-H y 6-H Pmb), 6.89-6.81 (m, 6H, Ar), 5.21 (s ancho, 2H, OCH₂), 4.56 (d, 1H, *J* = 15.4, 1-CH₂), 4.09 (d, 1H, *J* = 15.4, 1-CH₂), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.30 (d, 1H, *J* = 14.6, 4-CH₂), 3.21 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-H), 3.07 (d, 1H, *J* = 14.6, 4-CH₂), 1.25 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 175.4, 170.7 (CO), 159.0, 157.9, 137.0, 132.1, 131.1, 130.4, 129.9, 128.8, 128.4, 127.6, 114.9, 113.9 (C Ar), 69.5 (OCH₂), 65.2 (4-C), 55.2 (OMe), 52.8 (3-C), 45.7 (1-CH₂), 39.2 (4-CH₂), 10.0 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 515.4 [M+1]⁺. Anal. (%) Calc. para C₂₇H₂₅Cl₂NO₅: C, 63.04; H, 4.90; N, 2.72. Anal. Exp. (%): C, 63.02; H, 5.03; N, 2.69.

2.6.3. Procedimiento general para las reacciones de acoplamiento

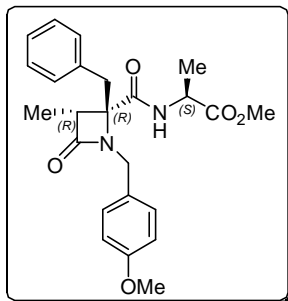
Sobre una disolución de la correspondiente 4-carboxi-2-azetidinona (0.18 mmol) en DCM o THF seco (5 ml) se añade sucesivamente la amina o el aminoéster correspondiente (0.36 mmol), BOP (0.36 mmol) y TEA (0.36 mmol). Tras una noche de agitación, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt y se lava sucesivamente con ácido cítrico (10%), NaHCO_3 (10%) y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

(3*S*,4*S*,1'*S*)-4-Bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-[(1'-metoxicarbonil)etil]carbamoil-2-azetidinona (2.89a)



Espuma. Rdto: 66% (a partir de **2.77a**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:3 a 1:2). HPLC (Novapak): t_R = 13.34 min (A:B = 40:60). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.32-7.15 (m, 5H, Ph), 7.05 (d, 2H, J = 8.6, 2H y 6H Pmb), 6.75 (d, 2H, J = 8.6, 3H y 5H Pmb), 5.62 (d, 1H, J = 7.1, 1'-NH), 4.61 (d, 1H, J = 15.4, 1- CH_2), 4.24 (m, 1H, 1'-H), 3.72 (s, 1H, OMe), 3.70 (m, 2H, 4- CH_2 , 1- CH_2), 3.63 (s, 3H, OMe), 3.24-3.08 (m, 2H, 3-H, 4- CH_2), 1.08 (d, 3H, J = 7.5, 3- CH_3), 0.84 (d, 3H, J = 7.3, 2'-H). EM (ES modo positivo): 425.2 ($\text{M}+1$)⁺ Anal (%) Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$: C 67.91, H 6.65, N 6.60. Exp (%): C, 67.49, H 6.32, N 6.38.

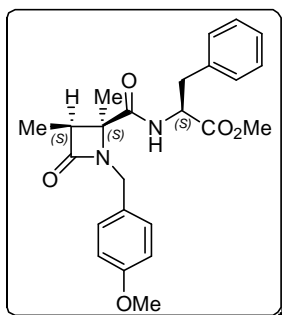
(3*R*,4*R*,1'*S*)-4-Bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-[(1'-metoxicarbonil)etil]carbamoil-2-azetidinona (2.89d)



Espuma. Rdto: 70% (a partir de **2.77d**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:3 a 1:2). HPLC (Novapak): t_R = 15.02 min (A:B = 40:60). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.29-7.17 (m, 5H, Ph), 6.90 (d, 2H, J = 8.5, 2H y 6H Pmb), 6.73 (d, 2H, J = 8.5, 3H y 5H Pmb), 5.84 (d, 1H, J = 7.5, 1'-NH), 4.70 (d, 1H, J = 15.1, 1- CH_2), 4.29 (m, 1H, 1'-H), 3.75 (d, 1H, J = 14.4, 4- CH_2), 3.68 (s, 1H, OMe), 3.63 (d, 1H, J = 15.1, 1- CH_2), 3.56 (s, 3H, OMe), 3.12-3.05 (m, 2H, 3-H, 4- CH_2), 1.13 (d, 3H, J = 7.6, 3- CH_3), 0.71 (d, 3H, J

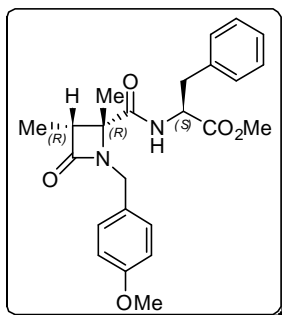
= 7.1, 2'-H). EM (ES modo positivo): 425.2 (M+1)⁺ Anal (%) Calc. para C₂₄H₂₈N₂O₅: C 67.91, H 6.65, N 6.60. Exp (%): C 67.55, H 6.90, N 6.57.

(3S,4S,1'S)-3,4-Dimetil-4-[(2'-fenil-1'-metoxycarbonil)etil]carbamoil-1-p-metoxibencil-2-azetidinona (2.90a)



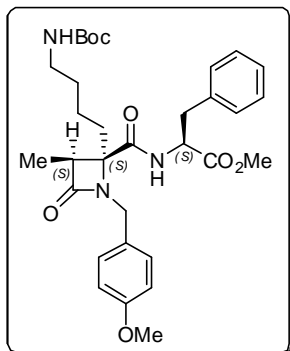
Aceite viscoso. Rdto: 69% (a partir de **2.84a**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:1 a 2:1). HPLC (Novapak): t_R = 13.20 min (A:B = 35:65). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.33 (d, 2H, J = 8.4, 2H y 6H Pmb), 7.31-7.21 (m, 3H, Ph), 6.95 (m, 2H, Ph), 6.89 (d, 2H, J = 8.1, 3H y 5H Pmb), 5.94 (d, 1H, J = 8.1, 1'-NH), 4.59-4.66 (m, 1H, 1'-H), 4.42 (d, 1H, J = 15.0, 1-CH₂), 4.11 (d, 1H, J = 15.0, 1-CH₂), 3.80, 3.72 (s, 3H, OMe), 3.04 (dd, 1H, J = 5.1, 13.8, 2'-H), 2.94 (c, 1H, J = 7.8, 3-H), 2.50 (dd, 1H, J = 9.6, 12.6, 2'-H), 1.46 (s, 3H, 4-CH₃), 0.73 (d, 3H, J = 7.5, 3-CH₃). EM (ES modo positivo): 425.2 (M+1)⁺, 447.3 (M+Na)⁺. Anal (%) Calc. para C₂₄H₂₈N₂O₅: C 67.91, H 6.65, N 6.60. Exp (%): C 68.06, H 6.79, N 6.25.

(3R,4R,1'S)-3,4-Dimetil-4-[(2'-fenil-1'-metoxycarbonil)etil]carbamoil-1-p-metoxibencil-azetidinona (2.90d)



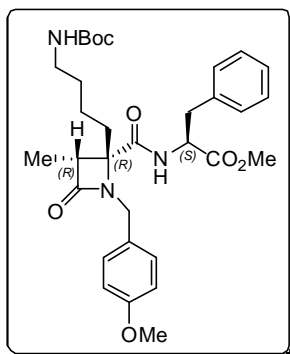
Aceite viscoso. Rdto: 45% (a partir **2.84d**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:2). HPLC (Novapak): t_R = 15.25 min (A:B = 35:65). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.24-7.35 (m, 3H, Ph), 7.11 (d, 2H, J = 8.4, 2H y 6H Pmb), 7.07 (m, 2H, Ph), 6.84 (d, 2H, J = 8.4, 3H y 5H Pmb), 6.20 (d, 1H, J = 7.5, 1'-NH), 4.74 (m, 1H, 1'-H), 4.74 (m, 1H, 1'-H), 4.19 (d, 1H, J = 15.2, 1-CH₂), 3.96 (d, 1H, J = 15.2, 1-CH₂), 3.78, 3.67 (s, 3H, OMe), 3.05-2.96 (m, 2H, 2'-H, 3-H), 2.70 (dd, 1H, J = 14.1, 7.5, 2'-H), 1.37 (s, 3H, 4-CH₃), 1.16 (d, 3H, J = 7.5, 3-CH₃). EM (ES modo positivo): 425.2 (M+1)⁺. Anal (%) Calc. for C₂₄H₂₈N₂O₅: C 67.91, H 6.65, N 6.60. Exp (%): C 67.89, H 6.31, N 6.44.

(3*S*,4*S*,1'*S*)-4-(4'-*tert*-Butoxicarbonilamino)butil-4-[(2''-fenil-1''-metoxycarbonil)etil]carbamoil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.91a)



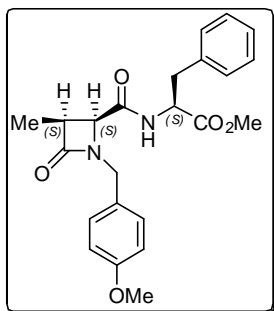
Aceite. 63%. (a partir de **2.85a**) Eluyente: AcOEt:hexano (1:4 a 1:2). HPLC (Novapak): $t_R = 7.93$ min (A:B = 45:55). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 7.29-6.80 (m, 9H, Ar), 5.88 (d, 1H, $J = 8.3$, 1''-NH), 4.57 (m, 1H, 1''-H), 4.45 (s ancho, 1H, 4'-NH), 4.39 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 4.05 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 3.72, 3.65 (s, 3H, OMe), 2.94 (m, 4H, 3-H, 2''-H, 4'-H), 2.36 (m, 1H, 2''-H), 1.85 (m, 2H, 1'-H), 1.36 (s, 9H, CH_3 ^{*t*}Bu), 1.28 (m, 3H, 2'-H y 3'-H), 1.11 (m, 1H, 3'-H), 0.63 (d, $J = 7.6$, 3H, 3- CH_3). EM (ES modo positivo): 604.2 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$: C 66.07, H 7.45, N 7.22. Exp (%): C 65.98, H 7.47, N 7.26.

(3*R*,4*R*,1'*S*)-4-(4'-*tert*-Butoxicarbonilamino)butil-4-[(2''-fenil-1''-metoxycarbonil)etil]carbamoil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.91d)



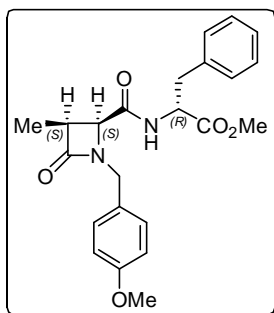
Aceite. Rdto: 63% (a partir de **2.85d**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:4 a 1:2). HPLC (Novapak): $t_R = 8.35$ min (A:B = 45:55). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.27-6.79 (m, 9H, Ar), 6.21(d, 1H, $J = 8.1$, 1''-NH), 4.75 (m, 1H, 1''-H), 4.41 (s ancho, 1H, 4'-NH), 4.19 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 3.89 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 3.71, 3.61 (s, 3H, OMe), 3.01 (m, 2H, 3-H, 2''-H), 2.87 (m, 2H, 4'-H), 2.63 (m, 1H, 2''-H), 1.70 (m, 2H, 1'-H), 1.37 (s, 9H, CH_3 ^{*t*}Bu), 1.12 (m, 3H, 2'-H, 3'-H), 1.07 (d, $J = 7.6$, 3H, 3- CH_3), 0.89 (m, 1H, 3'-H). EM (ES modo positivo): 604.3 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$: C 66.07, H 7.45, N 7.22. Exp (%): C 66.11, H 7.48, N 7.18.

(3*S*,4*S*,1'*S*)-4-[(2'-Fenil-1'-metoxycarbonil)etil]carbamoil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona ((*S,S,S*) **2.99)**



Espuma. Rdto: 71% (a partir de **2.97**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:4 a 2:1). HPLC (Novapak): $t_R = 24.24$ min (A:B = 28:72). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.81 (d, 2H, $J = 8.8$, 2*H* y 6*H* Pmb), 7.23 (m, 3H, Ph), 7.04 (m, 2H, Ph), 6.87 (d, 2H, $J = 8.8$, 3*H* y 5*H* Pmb), 6.03 (d, 1H, $J = 8.1$, 1'-NH), 4.87 (m, 1H, 1'-*H*), 4.58 (d, 1H, $J = 14.6$, 1- CH_2), 4.08 (d, 1H, $J = 14.6$, 1- CH_2), 3.86 (d, 1H, $J = 5.8$, 4-*H*), 3.79, 3.75 (s, 3H, OMe), 3.36 (m, 1H, 3-*H*), 3.14 (dd, 1H, $J = 14.1$, 5.3, 2'-*H*), 2.89 (dd, 1H, $J = 14.1$, 7.3, 2'-*H*), 0.92 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3). EM (ES modo positivo): 411.0 ($\text{M}+1$)⁺, 433 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$: C 67.30, H 6.38, N 6.82. Exp (%): C 67.55, H 6.49, N 6.37.

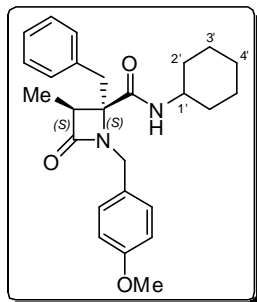
(3*S*,4*S*,1'*R*)-4-[(2'-Fenil-1'-metoxycarbonil)etil]carbamoil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona ((*S,S,R*) **2.99)**



Espuma. Rdto: 68% (a partir de **2.97**). Eluyente: AcOEt:hexano (1:4 a 2:1). HPLC (Novapak): $t_R = 25.97$ min (A:B = 28:72). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.24 (m, 3H, Ph), 7.04 (m, 2H, Ph), 6.89 (d, 2H, $J = 7.8$, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.74 (d, 2H, $J = 7.8$, 3*H* y 5*H* Pmb), 6.12 (d, 1H, $J = 7.9$, 1'-NH), 4.83 (m, 1H, 1'-*H*), 4.52 (d, 1H, $J = 14.8$, 1- CH_2), 3.74 (d, 1H, $J = 5.8$, 4-*H*), 3.71, 3.68 (s, 3H, OMe), 3.53 (d, 1H, $J = 14.8$, 1- CH_2), 3.32 (m, 1H, 3-*H*), 3.13 (dd, 1H, $J = 14.3$, 4.7, 2'-*H*), 2.89 (dd, 1H, $J = 14.3$, 7.7, 2'-*H*), 1.08 (d, 3H, $J = 7.7$, 3- CH_3). EM (ES modo positivo): 411.0 ($\text{M}+1$)⁺, 433.0 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$: C 67.30, H 6.38, N 6.82. Exp (%): C 67.48, H 6.56, N 6.99.

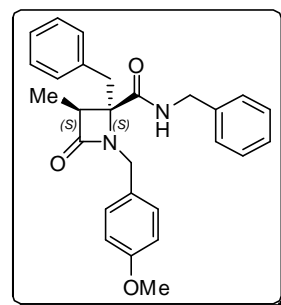
(3S,4S)-4-Bencil-4-ciclohexilcarbamoil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona

(2.147)



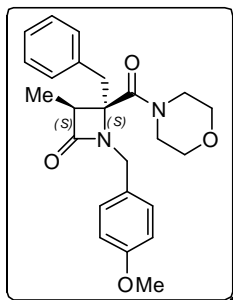
Sólido. Rdto: 87%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:5). P.f.: 147-149 °C. $[\alpha]_D = -65.5$ (*c* 1.08, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 4.81$ min (Gradiente de 50 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.27-7.19 (m, 5H, Ph), 6.85 (d, 2H, *J* = 8.7, 2H y 6H Pmb), 6.75 (d, 2H, *J* = 8.7, 3H y 5H Pmb), 5.29 (d, 1H, *J* = 8.3, CONH), 4.68 (d, 1H, *J* = 15.3, 1-CH₂), 3.83 (d, 1H, *J* = 14.3, 4-CH₂), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.53 (d, 1H, *J* = 15.3, 1-CH₂), 3.47 (m, 1H, 1'-H Chx), 3.07 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-H), 3.04 (d, 1H, *J* = 14.3, 4-CH₂), 1.44 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H Chx), 1.14 (m, 2H, 3'-H Chx), 1.09 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃), 0.79 (m, 1H, 3'-H Chx), 0.38 (m, 1H, 2'-H Chx), 0.20 (m, 1H, 2'-H Chx). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 171.2, 168.7 (CO), 159.6, 130.2, 130.0, 128.9, 128.6, 127.1, 114.6 (C Ar), 70.6 (4-C), 55.2 (OMe), 54.9 (3-C), 47.9 (1'-C Chx), 43.9 (1-CH₂), 40.2 (4-CH₂), 32.4, 32.9 (2'-C Chx), 25.2 (4'-C Chx), 24.7, 24.6 (3'-C Chx), 9.9 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 421.5 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₆H₃₂N₂O₃: C 74.26, H 7.67, N 6.66. Exp (%): C 74.32, H 7.70, N 6.27.

(3S,4S)-4-Bencil-4-bencilcarbamoil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.148)



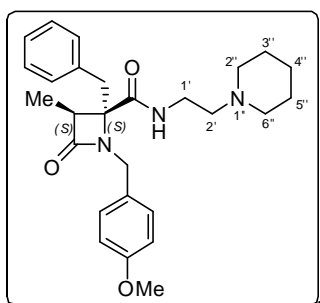
Aceite. Rdto: 98%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:10 a 1:2). $[\alpha]_D = -52.8$ (*c* 1.15, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 3.98$ min (Gradiente de 50 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.26-6.81 (m, 10H, Ar), 6.75 (d, 2H, *J* = 8.6, 2H y 6H Pmb), 6.52 (d, 2H, *J* = 8.6, 3H y 5H Pmb), 5.70 (m, 1H, CO-NH), 4.66 (d, 1H, *J* = 15.1, 1-CH₂), 4.11 (dd, 1H, *J* = 14.3, 6.2, NHCH₂Ph), 3.89 (dd, 1H, *J* = 14.3, 5.1, NHCH₂Ph), 3.81 (d, 1H, *J* = 14.5, 4-CH₂), 3.64 (s, 3H, OMe), 3.53 (d, 1H, *J* = 15.1, 1-CH₂), 3.09 (d, 1H, *J* = 14.5, 4-CH₂), 3.08 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-H), 1.07 d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.9, 169.8 (CO), 159.2, 136.9, 135.9, 130.1, 129.8, 128.7, 128.3, 127.9, 127.3, 127.2, 114.4 (C Ar), 70.7 (4-C), 54.9 (OMe), 53.3 (3-C), 44.2 (1-CH₂), 43.9 (NHCH₂Ph), 40.2 (4-CH₂), 10.2 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 429.5 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₇H₂₈N₂O₃: C 75.68, H 6.59, N 6.54. Exp (%): C 75.43, H 6.61, N 6.26.

(3S,4S)-4-Bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-(4-morfolino)carbonil-2-azetidinona (2.149)



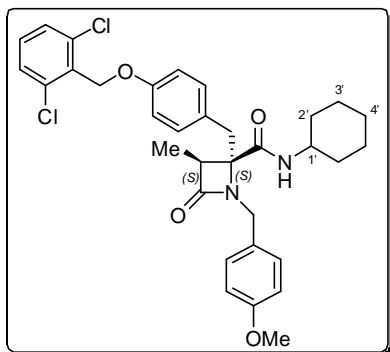
Aceite viscoso. Rdto: 62%. Eluyente: DCM:MeOH (20:1). $[\alpha]_D = -2.87$ (c 0.94, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 1.48$ min (Gradiente de 50 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.38 (d, 2H, $J = 8.7$, 2H y 6H Pmb), 7.23 (m, 3H, Ph), 6.91 (m, 2H, Ph), 6.84 (d, 2H, $J = 8.7$, 3H y 5H Pmb), 4.55 (d, 1H, $J = 15.2$, 1- CH_2), 4.48 (d, 1H, $J = 15.2$, 1- CH_2), 3.90-3.40 (m, 8H, CH_2 morfolina), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.34 (d, 1H, $J = 14.9$, 4- CH_2), 2.97 (d, 1H, $J = 14.9$, 4- CH_2), 2.84 (c, 1H, $J = 7.3$, 3-H), 1.24 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 169.7, 168.9 (CO), 158.7, 133.9, 130.0, 129.6, 129.5, 128.3, 127.5, 113.7 (C Ar), 69.3 (4-C), 66.9, 66.2 (CH_2 morfolina), 55.1 (OMe), 51.0 (3-C), 45.6 (1- CH_2), 39.9 (4- CH_2), 12.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 409.5 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$: C 70.57, H 6.91, N 6.86. Exp (%): C 70.33, H 7.16, N 6.51.

(3S,4S)-4-Bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-[(2'-piperidin-1''-il)etil]carbamoil-2-azetidinona (2.150)



Aceite viscoso. Rdto: 48%. Eluyente: DCM:MeOH (20:1). $[\alpha]_D = -36.0$ (c 0.81, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 3.54$ min (Gradiente de 20 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.31-7.18 (m, 5H, Ph), 7.04 (d, 2H, $J = 8.6$, 2H y 6H Pmb), 6.82 (d, 2H, $J = 8.6$, 3H y 5H Pmb), 5.84 (s ancho, 1H, CONH), 4.59 (d, 1H, $J = 15.2$, 1- CH_2), 3.87 (d, 1H, $J = 15.2$, 1- CH_2), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.69 (d, 1H, $J = 14.8$, 4- CH_2), 3.24 (m, 1H, 1'-H), 3.17 (d, 1H, $J = 14.8$, 4- CH_2), 3.13 (c, 1H, $J = 7.3$, 3-H), 2.92 (m, 1H, 1'-H), 2.21 (m, 4H, 2''-H, 6''-H), 2.12 (m, 1H, 2'-H), 1.99 (m, 1H, 2'-H), 1.46 (m, 4H, 3''-H, 5''-H), 1.39 (m, 2H, 4''-H), 1.16 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.6, 169.9 (CO), 159.1, 135.7, 129.9, 129.8, 128.7, 128.4, 126.9, 114.1 (C Ar), 70.1 (4-C), 56.5 (2'-C), 55.0 (OMe), 54.1 (3-C), 53.8 (2''-C, 6''-C), 44.4 (1- CH_2), 39.6 (4- CH_2), 35.6 (1'-C), 25.3 (3''-C, 5''-C), 23.7 (4''-C), 9.71 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 450.5 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3$: C 72.13, H 7.85, N 9.35. Exp (%): C 72.03, H 7.92, N 9.28.

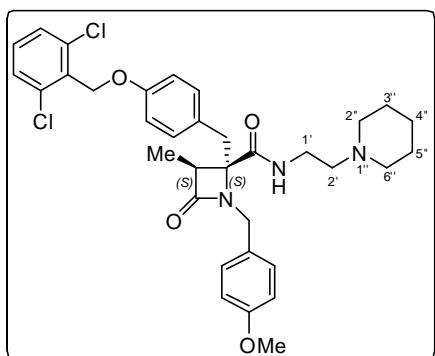
(3S,4S)-4-Ciclohexilcarbamoil-4-*p*-(2,6-diclorobenciloxi)bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.161)



Aceite viscoso. Rdto: 67%. Eluyente: AcOEt:hexano (1:4). $[\alpha]_D = -12.9$ (c 0.85, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 12.82$ min (Gradiente de 15 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.39-7.27 (m, 3H, $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$), 7.23 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Ar Tyr), 7.00 (d, 2H, $J = 8.4$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.96 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Ar Tyr), 6.83 (d, 2H, $J = 8.4$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 5.37 (s ancho, 1H, $J = 8.3$, NH),

5.29 (s ancho s, 2H, OCH_2), 4.77 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 3.83 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.66 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 3.55 (m, 1H, 1'-*H* Chx), 3.21 (c, 1H, $J = 7.5$, 3-*H*), 3.08 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 1.62-1.42 (m, 5H, 2'-*H*, 3'-*H* Chx), 1.21 (m, 1H, 3'-*H* Chx), 1.17 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3), 0.87 (m, 2H, 4'-*H* Chx), 0.48 (m, 1H, 3'-*H* Chx), 0.28 (m, 1H, 3'-*H* Chx). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 171.4, 168.9 (CO), 159.7, 158.2, 137.0, 132.1, 131.2, 130.5, 130.3, 129.1, 128.9, 128.5, 115.2, 114.8 (C Ar), 70.8 (OCH_2), 65.4 (4-C), 55.4 (OMe), 54.9 (3-C), 48.0 (1'-C Chx), 44.2 (1- CH_2), 39.5 (4- CH_2), 32.6, 32.2 (2'-C Chx), 25.4 (4'-C Chx), 24.9, 24.8 (3'-C Chx), 10.0 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 596.5 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$: C 66.55, H 6.09, N 4.70. Exp (%): C 66.98, H 6.13, N 4.35.

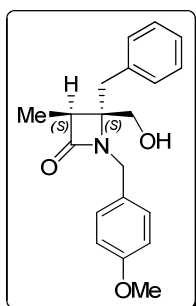
(3S,4S)-4-*p*-(2,6-Diclorobenciloxi)bencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-[(2'-piperidin-1''-il)etil]carbamoil-2-azetidinona (2.162)



Aceite viscoso. Rdto: 71%. Eluyente: MeOH: CH_2Cl_2 (1:20). $[\alpha]_D = -24.6$ (c 0.97, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 7.68$ min (Gradiente de 15 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.38-7.25 (m, 3H, $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$), 7.13 (d, 2H, $J = 8.5$, 2-*H* y 6-*H* Ar Tyr), 7.08 (d, 2H, $J = 8.2$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.95 (d, 2H, $J = 8.5$, 3-*H* y 5-*H* Ar Tyr), 6.84 (d, 2H, $J = 8.2$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 5.96 (s ancho, 1H, NH), 5.26 (s ancho, 2H, OCH_2), 4.59 (d, 1H, $J = 15.1$, 1-

CH_2), 3.97 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.63 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.27 (m, 1H, 1'- H), 3.13 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.13 (m, 1H, 3- H), 3.00 (m, 1H, 1'- H), 2.31 (m, 4H, 2''- H , 6''- H), 2.22 (m, 1H, 2'- H), 2.09 (m, 1H, 2'- H), 1.52 (m, 4H, 3''- H , 5''- H), 1.42 (m, 2H, 4''- H), 1.16 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.8, 170.6 (CO), 159.3, 158.1, 137.0, 132.1, 131.2, 130.4, 130.1, 128.9, 128.5, 115.1, 114.3 (C Ar), 70.5 (OCH_2), 65.3 (4- C), 56.9 (2'- C), 55.3 (3- C), 54.2 (2''- C , 6''- C), 54.1 (OMe), 44.6 (1- CH_2), 39.2 (4- CH_2), 36.2 (1'- C), 25.4 (3''- C , 5''- C), 23.8 (4''- C), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 625.5 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4$: C 65.38, H 6.29, N 6.73. Exp (%): C 65.12, H 6.43, N 6.68.

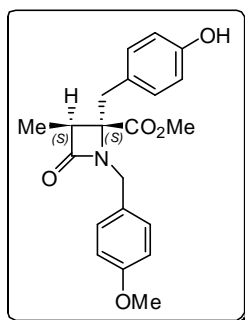
2.6.4. Síntesis de (3*S*,4*S*)-4-bencil-4-hidroximetil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidiona (2.88)



Una disolución del compuesto **2.87** (45 mg, 0.13 mmol) en THF seco (1 ml) se enfría a -15°C . A continuación, se añaden NMM (14 μl , 0.13 mmol) y cloroformato de isobutilo (68.6 μl , 0.13 mmol) y se deja agitando durante 10 min. El precipitado de hidrocloreuro de *N*-metilmorfolina formado se filtra y se lava con THF. El filtrado se enfría a -15°C y se añade una disolución de NaBH_4 (7.18 mg, 0.19 mmol) en H_2O (2.33 ml). Después de 1 h, se evaporan los disolventes a sequedad y el residuo resultante se disuelve en $\text{AcOEt}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Se separan las fases y el extracto orgánico se lava con ácido cítrico (10%), NaHCO_3 (10%), disolución saturada de NaCl y se seca sobre Na_2SO_4 . Se elimina el disolvente y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente un gradiente de $\text{AcOEt}:\text{hexano}$ (1:5 a 1:3), obteniéndose 33.4 mg (79%) del producto deseado en forma de aceite viscoso. $[\alpha]_{\text{D}} = +8.47$ (c , 0.95, MeOH). HPLC (Novapak): $t_{\text{R}} = 8.75$ min (A:B = 35:65). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.10-7.25 (m, 7H, Ar), 6.81 (d, 2H, $J = 8.6$, 3*H* y 5*H* Pmb), 4.63 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 4.03 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.41 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.06-3.41 (m, 2H, 3- H , 4- CH_2), 2.70 (d, 1H, $J = 13.4$, 4- CH_2), 1.00 (d, 3H, $J = 7.6$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 170.8 (CO), 159.7, 136.5, 130.1, 130.0, 129.9, 129.0, 127.4 114.8 (C Ar), 68.9 (4- C), 63.9 (4- CH_2OH), 55.7 (OMe), 51.9 (3- C), 43.5 (1- CH_2), 40.2 (4- CH_2), 8.8 (3- CH_3). EM (ES modo positivo):

326.3 $[M+1]^+$. Anal (%) Calc. para $C_{20}H_{23}NO_3$: C 73.82, H 7.12, N 4.30. Exp (%): C 73.47, H 7.46, N 4.06.

2.6.5. Síntesis de (3*S*,4*S*)-4-*p*-hidroxibencil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona (**2.163**)



A una disolución de la beta lactama **2.158** (46 mg, 0.1 mmol) en MeOH (15 ml) se le añade Pd/C (0.05 mg, 10%). La suspensión se hidrogena 30 psi de presión y a temperatura ambiente durante 4 h. Tras filtrar el catalizador se evapora el disolvente a sequedad, obteniéndose 37 mg (98%) del producto **2.163** en forma de aceite. $[\alpha]_D = -4.1$ (c 1.10, $CHCl_3$). HPLC (Sunfire): $t_R = 7.21$ min (Gradiente de 15 a 100% A en 15 min). 1H RMN (300 MHz,

$CDCl_3$): 7.18 (d, 2H, $J = 8.8$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.83 (d, 2H, $J = 8.8$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 6.78 (d, 2H, $J = 8.6$, 2-*H* y 6-*H* 4-Bn), 6.63 (d, 2H, $J = 8.6$, 3-*H* y 5-*H* 4-Bn), 4.41 (d, 1H, $J = 15.3$, 1- CH_2), 4.21 (d, 1H, $J = 15.3$, 1- CH_2), 3.79, 3.69 (s, 3H, OMe), 3.22 (d, 1H, $J = 14.2$, 4- CH_2), 3.12 (c, 1H, $J = 7.5$, 3-*H*), 3.05 (d, 1H, $J = 14.2$, 4- CH_2), 1.13 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): 171.7, 170.2 (CO), 158.9, 155.2, 131.1, 129.9, 128.7, 126.4, 115.4, 113.8 (C Ar), 69.2 (4-C), 55.3 (OMe), 52.9 (3-C), 52.1 (OMe), 45.5 (1- CH_2), 39.1 (4- CH_2), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 370.4 $[M+1]^+$. Anal. (%) Calc. para: $C_{21}H_{23}NO_5$: C, 68.28; H, 6.28; N, 3.79. Anal. Exp. (%): C, 68.32; H, 6.31; N, 3.44.

2.6.6. Síntesis en fase sólida de β -lactamas 1,3,4,4-tetrasustituidas

Métodos analíticos.

Los test colorimétricos empleados, Kaiser (aminas primarias) y cloranilo (aminas secundarias) han sido descritos detalladamente en el Capítulo 1 (página 87).

Protocolos generales de síntesis en fase sólida.

Aspectos generales.

La síntesis en fase sólida de los productos descritos en este capítulo se ha llevado a cabo en jeringuillas de polipropileno, siguiendo las directivas generales ya indicadas en el Capítulo 1 (página 88).

En este caso se ha empleado como soporte polimérico una resina Fmoc-Xaa-Wang, que porta los aminoácidos seleccionados anclados a través del grupo carboxilato.

Aminación reductora en fase sólida

Una vez eliminado el grupo protector Fmoc con piperidina/DMF (20:80), las resinas (0.2 mmol), previamente hinchadas, se lavan con TMOF (2 x 0.5 min). A continuación se añade TMOF y el aldehído correspondiente (1.2 mmol). En el caso del isobutiraldehído y del butanal es necesaria la adición de un 1% de MeOH a la mezcla de reacción. Se deja reaccionar unas 18 h y transcurrido este tiempo se filtra el sobrenadante y se lava la resina con TMOF (1 x 0.5 min). A continuación, se añade de nuevo TMOF y se adiciona NaBH_3CN (0.6 mmol), previamente disuelto en TMOF, seguido de un 1% de ácido acético. Se deja reaccionar durante 24 h. Transcurrido este tiempo se elimina el exceso de reactivos mediante filtración, se realizan lavados con DMF/DMF:MeOH(1:1)/DCM (5 x 0.5 min) y la resina se seca a vacío. Esta reacción fue monitorizada mediante el test de Kaiser de aminas primarias.

Incorporación del grupo cloropropionilo

Método A: La resina (0.2 mmol) se hincha en DCM (5 x 0.5 min) y THF (2 x 0.5 min). A continuación se añade THF y se adicionan sucesivamente ácido 2-(*S*)-cloropropiónico (1 mmol) y una mezcla previamente disuelta en THF de PyBroP (1 mmol) y DIEA (0.9 mmol). Se deja reaccionar durante 5 h. Transcurrido ese tiempo, se elimina el exceso de

reactivos y se lava con THF/DMF/DCM/THF (5 x 0.5 min). Se repite la reacción en idénticas condiciones. Transcurridas 12 h se elimina el exceso de reactivos mediante filtración y tras lavados con THF/DMF:MeOH(1:1)/DMF/DCM:MeOH(1:1)/DCM (5 x 0.5 min), la resina se seca a vacío.

Metodo B: La resina (0.2 mmol) se hincha en DCM (5 x 0.5 min) y THF (2 x 0.5 min). A continuación se añade THF y se adiciona óxido de propileno (3 mmol). Se enfría a 0°C y se añade cloruro de cloropropionilo (1 mmol). Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido ese tiempo, se elimina el exceso de reactivos y se lava con THF/DMF/DCM/THF (5 x 0.5 min). Se repite la reacción en idénticas condiciones. Transcurridas 12 h se elimina el exceso de reactivos mediante filtración y tras lavados con THF/DMF:MeOH(1:1)/DMF/DCM:MeOH(1:1)/DCM (5 x 0.5 min), la resina se seca a vacío.

Metodo C: La resina (0.2 mmol) se hincha en DCM (5 x 0.5 min) y THF (2 x 0.5 min). A continuación se añade THF y se adiciona sucesivamente ácido 2-(S)-cloropropiónico (1 mmol), Cl_3CCN (2.25 mmol) y DIEA (2.25 mmol). Se enfría a 0°C y se añade Ph_3P (2.4 mmol) previamente disuelta en THF. Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido ese tiempo, se elimina el exceso de reactivos y se lava con THF/DMF/DCM/THF (5 x 0.5 min). Se repite la reacción en idénticas condiciones. Transcurridas 12 h se elimina el exceso de reactivos mediante filtración y tras lavados con THF/DMF:MeOH(1:1)/DMF/DCM:MeOH(1:1)/DCM (5 x 0.5 min), la resina se seca a vacío.

Metodo D: La resina (0.2 mmol) se hincha en DCM (5 x 0.5 min) y THF (2 x 0.5 min). A continuación se añade THF y se adiciona sucesivamente ácido 2-(S)-cloropropiónico (1 mmol), Cl_3CCN (2.25 mmol) y óxido de propileno (3 mmol). Se enfría a 0°C y se añade Ph_3P (2.4 mmol) previamente disuelta en THF. Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido ese tiempo, se elimina el exceso de reactivos y se lava con THF/DMF/DCM/THF (5 x 0.5 min). Se repite la reacción en idénticas condiciones. Transcurridas 12 h se elimina el exceso de reactivos mediante filtración y tras lavados

con THF/DMF:MeOH(1:1)/DMF/DCM:MeOH(1:1)/DCM (5 x 0.5 min), la resina se seca a vacío.

En todos los métodos empleados, la evolución de esta reacción fue monitorizada mediante el test de cloranilo de aminas secundarias.

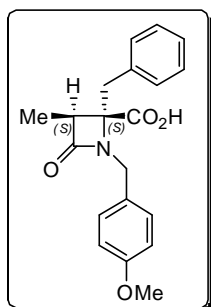
Ciclación intramolecular en medio básico al anillo de β -lactama

Las resinas (0.2 mmol) se lavan con DCM/DMF/DCM/DMF (5 x 0.5 min) y DMF anhidra (2 x 0.5 min). Se suspenden en DMF anhidra y a continuación se añade BTTP (1 mmol) bajo atmósfera de Ar. Se deja reaccionar durante 15 h. Transcurrido ese tiempo, se elimina el exceso de reactivos y se lava con DMF/DCM/DMF/DCM (5 x 0.5 min.). Se repite la reacción en idénticas condiciones. Finalmente se elimina el exceso de reactivos mediante filtración y lavados con DMF/DCM/DMF/DCM (5 x 0.5 min) y se seca a vacío.

Desanclaje de las β -lactamas de la resina

Las resinas (0.2 mmol) se tratan con 1.5 ml de una mezcla de TFA/H₂O (95:5) a temperatura ambiente durante 3 h. Pasado este tiempo se lava la resina con DCM (3 x 3 ml) recogiendo los lavados en un matraz. Se elimina el disolvente a presión reducida y el crudo resultante se liofiliza. Los crudos de reacción se purifican en cartuchos de extracción de gel de sílice (derivados de Phe, Ala, Glu) o de fase reversa (derivados de Lys).

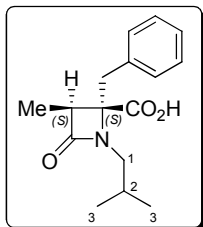
(3*S*,4*S*)-4-Bencil-4-carboxi-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidionona (2.116a)



Sólido. Rdto: 12%. Cartucho gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 60:1).

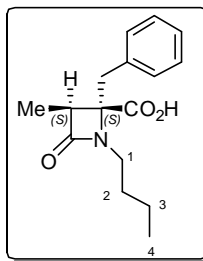
Los datos espectroscópicos y analíticos ya han sido descritos para el mismo producto preparado en disolución (2.87).

(3S,4S)-4-Bencil-4-carboxi-1-isobutil-3-metil-2-azetidinona (2.116b)



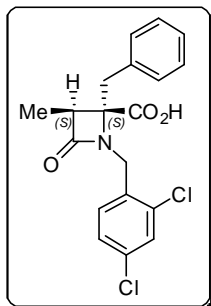
Aceite viscoso. Rdto: 61%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 50:1). $[\alpha]_D^{25} = -20.05$ (c 1.35, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 17.40$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 8.59 (s ancho, 1H, CO_2H), 7.31-7.21 (m, 5H, Ph), 3.49 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.23 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.15 (c, 1H, $J = 7.8$, 3- H), 2.92 (m, 2H, $H1$ - $i\text{Bu}$), 2.09 (m, 1H, $H2$ - $i\text{Bu}$), 1.23 (d, 3H, $J = 7.8$, 3- CH_3), 0.88 (d, 3H, $J = 6.3$, $H3$ - $i\text{Bu}$), 0.86 (d, 3H, $J = 6.7$, $H3$ - $i\text{Bu}$). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.2, 170.7 (CO), 134.9, 129.9, 128.6, 127, 3 (C Ar), 68.4 (4-C), 52.9 (3-C), 50.6 (C1- $i\text{Bu}$), 39.9 (4- CH_2), 27.5 (C2- $i\text{Bu}$), 20.6 (C3- $i\text{Bu}$), 10.3 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 276.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$: C 69.79, H 7.69, N 5.09. Exp (%): C 69.45, H 7.84, N 5.06.

(3S,4S)-4-Bencil-1-butyl-4-carboxi-3-metil-2-azetidinona (2.116c)



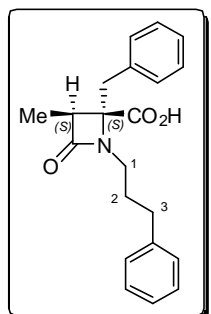
Espuma. Rdto: 49%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 50:1). $[\alpha]_D^{25} = -10.90$ (c 0.58, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 17.50$ min (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.31-7.22 (m, 5H, Ar), 3.53 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.16 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.01 (m, 3H, 3- H y $H1$ -Bu), 1.68 (m, 2H, $H2$ -Bu), 1.23 (d, 3H, $J = 7.8$, 3- CH_3), 1.22 (m, 2H, $H3$ -Bu), 0.84 (t, 3H, $J = 7.3$, $H4$ -Bu). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.4, 170.2 (CO), 135.0, 129.9, 129.0, 128.6, 127.4 (C Ar), 68.6 (4-C), 53.0 (3-C), 43.3 (C1-Bu), 40.2 (4- CH_2), 30.1 (C2-Bu), 20.4 (C3-Bu), 13.6 (C4-Bu), 10.3 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 276.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$: C 69.79, H 7.69, N 5.09. Exp (%): C 69.36, H 7.85, N 4.84.

(3S,4S)-4-Bencil-4-carboxi-1-(2,4-diclorobencil)-3-metil-2-azetidinona (2.116d)



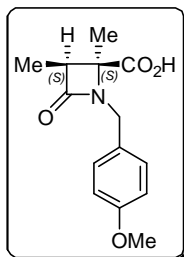
Aceite viscoso. Rdto: 45%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 80:1). $[\alpha]_D = -3.81$ (*c* 0.67, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 21.12$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.32-6.96 (m, 8H, Ar), 4.48 (d, 1H, $J = 16.6$, 1- CH_2), 4.28 (d, 1H, $J = 16.6$, 1- CH_2), 3.49 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 3.29 (c, 1H, $J = 7.8$, 3- H), 3.14 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 1.27 (d, 3H, $J = 7.8$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 177.9, 170.5 (CO), 134.4, 133.7, 133.6, 132.8, 130.9, 129.8, 128.9, 127.4, 127.2 (C Ar), 69.3 (4-C), 53.2 (3-C), 42.9 (1- CH_2), 40.2 (4- CH_2), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 378.3 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{NO}_3$: C 60.33, H 4.53, N 3.70. Exp (%): C 60.41, H 4.79, N 3.42.

(3S,4S)-4-Bencil-4-carboxi-1-(3-fenilpropil)-3-metil-2-azetidinona (2.116e)



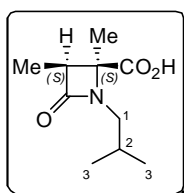
Aceite viscoso. Rdto: 37%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 60:1). $[\alpha]_D = -10.56$ (*c* 0.94, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 19.75$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 8.60 (s ancho, 1H, CO_2H), 7.31-7.14 (m, 10H, Ar), 3.55 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.17 (d, 1H, $J = 14.6$, 4- CH_2), 3.16 (c, 1H, $J = 7.6$, 3- H), 3.06 (m, 2H, $H1\text{-Pr}$), 2.55 (m, 2H, $H3\text{-Pr}$), 2.07 (m, 2H, $H2\text{-Pr}$), 1.23 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.3, 170.2 (CO), 141.2, 140.3, 134.9, 129.8, 128.7, 128.5, 128.3, 127.4, 125.8 (C Ar), 68.7 (4-C), 53.2 (C1-Pr), 43.1 (3-C), 40.3 (4- CH_2), 33.5 (C3-Pr), 29.5 (C2-Pr), 10.2 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 338.3 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_3$: C 74.75, H 6.87, N 4.15. Exp (%): C 74.67, H 6.72, N 3.97.

(3S,4S)-4-Carboxi-3,4-dimetil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.117a)



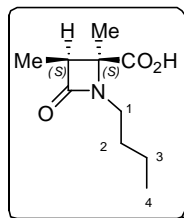
Aceite viscoso. Rdto: 14%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 120:1 a 90:1). $[\alpha]_D = -10.58$ (*c* 0.64, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 13.76$ min (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.22 (d, 2H, $J = 8.3$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.84 (d, 2H, $J = 8.3$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 4.79 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 4.11 (d, 1H, $J = 15.1$, 1- CH_2), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.08 (c, 1H, $J = 7.3$, 3-*H*), 1.29 (s, 3H, 4- CH_3), 1.25 (d, 1H, $J = 7.3$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.3, 169.2 (CO), 159.3, 130.1, 128.1, 114.0 (C Ar), 64.8 (4-C), 56.2 (3-C), 55.2 (OMe), 44.3 (1- CH_2), 21.6 (4- CH_3), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 264.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: C 63.87, H 6.51, N 5.32. Exp (%): C 63.68, H 6.70, N 5.25.

(3S,4S)-4-Carboxi-3,4-dimetil-1-isobutil-2-azetidinona (2.117b)



Espuma higroscópica. Rdto: 47%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 80:1). $[\alpha]_D = -99.15$ (*c* 1.51, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 12.39$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 10.44 (s ancho, 1H, CO_2H), 3.17 (dd, 1H, $J = 8.1$, 14.2, $\text{H}1$ -*i*Bu), 3.11 (c, 1H, $J = 7.3$, 3-*H*), 2.88 (dd, 1H, $J = 7.3$, 14.2, $\text{H}1$ -*i*Bu), 1.99 (m, 1H, $\text{H}2$ -*i*Bu), 1.65 (s, 3H, 4- CH_3), 1.23 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3), 0.92 (d, 3H, $J = 6.3$, $\text{H}3$ -*i*Bu), 0.91 (d, 3H, $J = 6.8$, $\text{H}3$ -*i*Bu). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.9, 170.3 (CO), 66.4 (4-C), 55.5 (3-C), 49.3 ($\text{C}1$ -*i*Bu), 27.5 ($\text{C}2$ -*i*Bu), 20.6 ($\text{C}3$ -*i*Bu), 10.3 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 200.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3$: C 60.28, H 8.60, N 7.03. Exp (%): C 60.25, H 8.56, N 7.07.

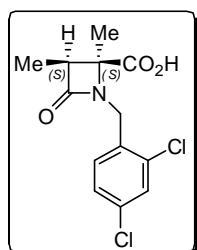
(3S,4S)-1-Butil-4-carboxi-3,4-dimetil-2-azetidinona (2.117c)



Aceite viscoso. Rdto: 26%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 80:1). $[\alpha]_D = -53.33$ (*c* 0.76, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 12.57$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 8.14 (s ancho, 1H, CO_2H), 3.34 (dd, 1H, $J = 7.8$, 15.6, $\text{H}1$ -Bu), 3.11 (m, 2H, 3-*H* y $\text{H}1$ -Bu), 1.67 (s, 3H, 4- CH_3), 1.60 (m, 2H, $\text{H}2$ -Bu), 1.33 (m, 2H, $\text{H}3$ -Bu), 1.23 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3), 0.91 (t, 3H, $J =$

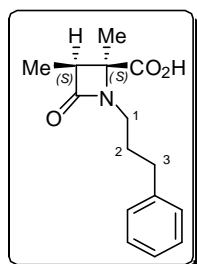
7.3, *H4*-Bu). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.7, 169.9 (CO), 64.5 (4-C), 55.6 (3-C), 41.2 (C1-Bu), 30.4 (C2-Bu), 20.9 (4- CH_3), 20.4 (C3-Bu), 13.6 (C4-Bu), 10.0 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 200.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3$: C 60.28, H 8.60, N 7.03. Exp (%): C 60.15, H 8.73, N 6.88.

(3*S*,4*S*)-4-Carboxi-1-(2,4-diclorobencil)-3,4-dimetil-2-azetidinona (2.117d)



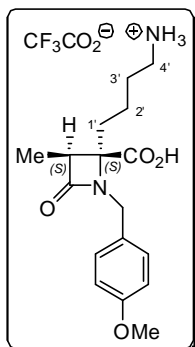
Aceite viscoso Rdto: 47%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 80:1). $[\alpha]_D = -18.62$ (*c* 1.34, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 17.14$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 9.49 (s ancho, 1H, CO_2H), 7.37 (d, 1H, $J = 8.2$, 6H-Ar), 7.36 (d, 1H, $J = 2.1$, 3H-Ar), 7.22 (dd, 1H, $J = 2.1$, 8.2, 5H-Ar), 4.75 (d, 1H, $J = 15.3$, 1- CH_2), 4.42 (d, 1H, $J = 15.3$, 1- CH_2), 3.14 (c, 1H, $J = 7.3$, 3-*H*), 1.39 (s, 3H, 4- CH_3), 1.25 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.4, 169.7 (CO), 134.6, 134.4, 132.1, 131.9, 129.4, 127.5 (C Ar), 65.1 (4-C), 56.2 (3-C), 41.7 (1- CH_2), 20.8 (4- CH_3), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 302.0 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_3$: C 51.68, H 4.34, N 4.64. Exp (%): C 51.77, H 4.51, N 4.50.

(3*S*,4*S*)-4-Carboxi-3,4-dimetil-1-(3-fenilpropil)-2-azetidinona (2.117e)



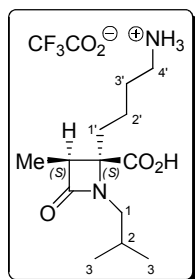
Aceite viscoso. Rdto: 29%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 90:1). $[\alpha]_D = -26.64$ (*c* 0.97, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 16.05$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.27-7.15 (m, 5H, Ar), 3.32 (m, 2H, *H1*-Pr), 3.07 (c, 1H, $J = 7.4$, 3-*H*), 2.65 (m, 2H, *H3*-Pr), 1.95 (m, 2H, *H2*-Pr), 1.63 (s, 3H, 4- CH_3), 1.20 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 174.7, 168.6 (CO), 140.2, 129.9, 128.1, 127.9, 127.6, 125.2 (C Ar), 63.5 (4-C), 54.8 (3-C), 39.9 (C1-Pr), 32.5 (C3-Pr), 29.1 (C2-Pr), 19.6 (4- CH_3), 9.9 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 262.3 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_3$: C 68.94, H 7.33, N 5.36. Exp (%): C 70.05, H 7.36, N 5.31.

Trifluoroacetato de (3S,4S)-4-(4'-aminobutil)-4-carboxi-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidionona (2.118a)



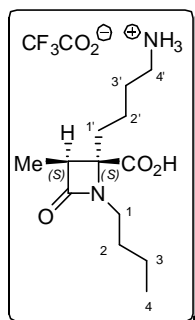
Aceite viscoso. Rdto: 24%. Cartucho de fase reversa. Eluyente: H₂O:MeCN (Gradiente de 0 a 10% MeCN). $[\alpha]_D = -8.86$ (*c* 0.61, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 8.72$ min (Gradiente de 0 a 100% A). ¹H RMN (300MHz, D₂O): δ 7.14 (d, 2H, *J* = 8.5, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.83 (d, 2H, *J* = 8.5, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 4.64 (d, 2H, *J* = 15.8, 1-CH₂), 4.02 (d, 2H, *J* = 15.8, 1-CH₂), 3.65 (s, 3H, OMe), 2.95 (c, 1H, *J* = 7.3, 3-*H*), 2.42 (m, 2H, 4'-*H*), 1.67 (m, 1H, 1'-*H*), 1.50 (m, 1H, 1'-*H*), 1.04 (m, 2H, 2'-*H*), 0.97 (d, 3H, *J* = 7.3, 3-CH₃), 0.86 (m, 2H, 3'-*H*). ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 177.4, 174.4 (CO), 158.6, 131.3, 129.6, 114.6 (*C* Ar), 71.9 (4-*C*), 55.8 (OMe), 51.2 (3-*C*), 44.9 (1-CH₂), 39.3 (4'-*C*), 34.5 (1'-*C*), 27.1 (3'-*C*), 21.3 (2'-*C*), 9.9 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 321.2 [M+1]⁺.

Trifluoroacetato de (3S,4S)-4-(4'-aminobutil)-4-carboxi-1-isobutil-3-metil-2-azetidionona (2.118b)



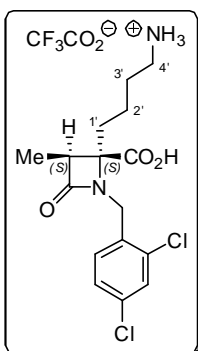
Aceite viscoso. Rdto: 33%. Cartucho de fase reversa. Eluyente: H₂O:MeCN (Gradiente de 0 to 5% MeCN). $[\alpha]_D = -43.74$ (*c* 0.74, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 7.34$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ¹H RMN (300MHz, D₂O): δ 2.99 (dd, 1H, *J* = 9.0, 14.4, H1-*i*Bu), 2.93 (c, 1H, *J* = 7.8, 3-*H*), 2.83 (m, 3H, H1-*i*Bu, 4'-*H*), 1.94 (m, 1H, 1'-*H*), 1.76 (m, 2H, H2-*i*Bu, 1'-*H*), 1.52 (m, 2H, 3'-*H*), 1.39 (m, 1H, 2'-*H*), 1.25 (m, 1H, 2'-*H*), 0.93 (d, 3H, *J* = 7.8, 3-CH₃), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.5, H3-*i*Bu), 0.73 (d, 3H, *J* = 6.3, H3-*i*Bu). ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 177.3, 174.7 (CO), 71.3 (4-*C*), 50.8 (3-*C*), 40.4 (C1-*i*Bu), 39.5 (4'-*C*), 34.7 (1'-*C*), 28.4 (C2-*i*Bu), 27.5 (3'-*C*), 21.9 (2'-*C*), 20.3, 20.1 (C3-*i*Bu), 9.9 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 257.3 [M+1]⁺.

Trifluoroacetato de (3S,4S)-4-(4'-aminobutil)-1-butil-4-carboxi-3-metil-2-azetidinona (2.118c)



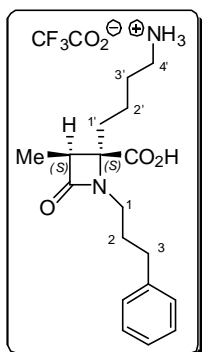
Aceite viscoso. Rdto: 34%. Cartucho de fase reversa. Eluyente: H₂O:MeCN (Gradiente de 0 a 5% MeCN). $[\alpha]_D = -99.15$ (*c* 1.51, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 7.69$ min. (Gradiente de 0 a 100% A). ¹H RMN (300MHz, D₂O): δ 3.18 (m, 1H, *H*1-Bu), 2.99 (m, 2H, *H*1-Bu, 3-*H*), 2.84 (m, 2H, 4'-*H*), 1.89 (m, 2H, 1'-*H*), 1.50 (m, 5H, *H*2-Bu, 3'-*H*, 2'-*H*), 1.32 (m, 1H, 3'-*H*), 1.18 (m, 2H, *H*3-Bu), 0.96 (d, 3H, *J* = 7.3, 3-CH₃), 0.74 (t, 3H, *J* = 7.3, *H*4-Bu). ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 176.5, 174.1 (CO), 70.2 (4-*C*), 51.0 (3-*C*), 42.5 (C1-Bu), 39.5 (4'-*C*), 33.7 (1'-*C*), 30.5 (C2-Bu), 27.4 (2'-*C*), 22.8 (3'-*C*), 20.4 (C3-Bu), 13.3 (C4-Bu), 9.7 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 257.3 [M+1]⁺.

Trifluoroacetato de (3S,4S)-4-(4'-aminobutil)-4-carboxi-1-(2,4-diclorobencil)-3-metil-2-azetidinona (2.118d)



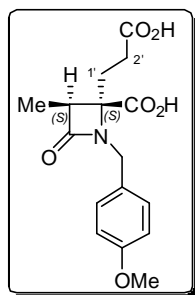
Espuma higroscópica. Rdto: 23%. Cartucho de fase reversa. Eluyente: H₂O:MeCN (Gradiente de 0 a 10% MeCN). $[\alpha]_D = -3.94$ (*c* 0.73, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.72$ min (Gradiente de 0 a 100% A). ¹H RMN (300MHz, D₂O): δ 7.41 (s, 1H, Ar), 7.24 (m, 2H, Ar), 4.64 (d, 1H, *J* = 16.1, 1-CH₂), 4.32 (d, 1H, *J* = 16.1, 1-CH₂), 3.01 (c, 1H, *J* = 7.3, 3-*H*), 2.49 (m, 2H, 4'-*H*), 1.63 (m, 2H, 1'-*H*), 1.11 (m, 2H, 3'-*H*), 0.98 (d, 3H, *J* = 7.3, 3-CH₃), 0.84 (m, 2H, 2'-*H*). ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 177.2, 174.5 (CO), 134.2, 134.2, 132.8, 131.8, 129.6, 127.9 (C Ar), 71.9 (4-*C*), 51.0 (3-*C*), 42.8 (1-CH₂), 39.3 (4'-*C*), 34.1 (1'-*C*), 27.2 (3'-*C*), 21.1 (2'-*C*), 9.8 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 359.2 [M+1]⁺.

Trifluoroacetato de (3*S*,4*S*)-4-(4'-aminobutil)-4-carboxi-1-(3-fenilpropil)-3-metil-2-azetidinona (2.118e)



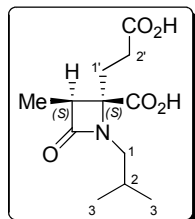
Aceite viscoso. Rdto: 41%. Cartucho de fase reversa. Eluyente: H₂O:MeCN (Gradiente de 0 a 5% MeCN). $[\alpha]_D = -31.98$ (*c* 1.15, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.38$ min (Gradiente de 0 a 100% A). ¹H RMN (300MHz, D₂O): δ 7.23-7.08 (m, 5H, Ar), 3.24 (m, 1H, H1-Pr), 2.98 (m, 1H, H1-Pr), 2.85 (c, 1H, *J* = 7.6, 3-*H*), 2.72 (m, 2H, 4'-*H*), 2.49 (m, 2H, H3-Pr), 1.77 (m, 4H, 1'-*H* y H2-Pr), 1.45 (m, 2H, 3'-*H*), 1.17 (m, 2H, 2'-*H*), 0.93 (d, 3H, *J* = 7.6, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 177.5, 174.4 (CO), 142.3, 129.1, 128.9, 126.5 (C Ar), 71.3 (4-C), 50.9 (3-C), 42.2 (C1-Pr), 39.5 (4'-C), 34.6 (1'-C), 33.1 (C3-Pr), 30.3 (C2-Pr), 27.4 (3'-C), 21.7 (2'-C), 9.9 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 319.2 [M+1]⁺.

(3*S*,4*S*)-4-Carboxi-4-(2'-carboxietil)-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.119a)



Espuma higroscópica. Rdto: 12%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM (0.1 % AcOH):MeOH (Gradiente de 0 a 1% MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 11.46$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). ¹H RMN (300MHz, Acetona-d₆): δ 7.30 (d, 2H, *J* = 8.5, 2H y 6H Pmb), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.5, 3H y 5H Pmb), 4.68 (d, 1H, *J* = 15.1, 1-CH₂), 4.11 (d, 1H, *J* = 15.1, 1-CH₂), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.26 (c, 1H, *J* = 7.3, 3-*H*), 2.28 (m, 1H, 1'-*H*), 2.12 (m, 3H, 1'-*H* y 2'-*H*), 1.17 (d, 3H, *J* = 7.3, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, Acetona-d₆): δ 174.7, 174.0, 170.4 (CO), 161.1, 131.5, 131.4, 115.7 (C Ar), 69.4 (4-C), 56.5 (OMe), 54.4 (3-C), 46.1 (1-CH₂), 30.4 (1'-C), 30.2 (2'-C), 11.5 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 322.3 [M+1]⁺.

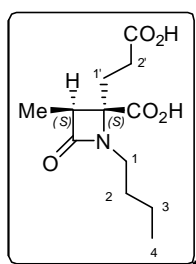
(3*S*,4*S*)-4-Carboxi-4-(2'-carboxietil)-1-isobutil-3-metil-2-azetidinona (2.119b)



Sólido céreo. Rdto: 24%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM (0.1 % AcOH):MeOH (Gradiente de 0 a 1% MeOH). $[\alpha]_D = -51.58$ (*c* 0.91, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.29$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). ¹H RMN (300MHz, Acetona-d₆): δ 3.25 (c, 1H, *J* = 7.3, 3-*H*), 3.10 (dd, 1H, *J* = 8.3, 14.2, H1-^{*i*}Bu), 2.91 (dd, 1H, *J* = 6.8, 14.2, H1-^{*i*}Bu), 2.65 (m, 1H, 2'-*H*), 2.45 (m, 2H, 1'-*H*, 2'-*H*), 2.28 (m, 1H, 1'-*H*), 2.05

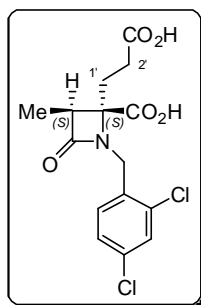
(m, 1H, $H2$ - i Bu), 1.15 (d, 3H, $J = 7.3$, 3- CH_3), 0.94 (d, 6H, $J = 7.3$, $H3$ - i Bu). ^{13}C RMN (75 MHz, Acetona- d_6): δ 174.9, 173.9, 170.9 (CO), 68.7 (4-C), 53.9 (3-C), 51.3 (C1- i Bu), 31.3 (C2- i Bu), 30.8 (1'-C), 30.6 (2'-C), 22.0, 21.9 (C3- i Bu), 11.5 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 258.2 $[M+1]^+$. Anal (%) Calc. para $C_{12}H_{19}NO_5$: C 56.02, H 7.44, N 5.44. Exp (%): C 56.13, H 7.69, N 5.21.

(3S,4S)-1-Butil-4-carboxi-4-(2-carboxietil)-3-metil-2-azetidinona (2.119c)



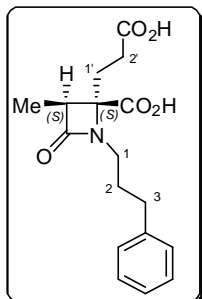
Espuma higroscópica. Rdto: 24%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM (0.1 % AcOH):MeOH (Gradiente de 0 a 1% MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.47$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). 1H RMN (300MHz, Acetona- d_6): δ 3.21 (m, 3H, 3-H, $H1$ -Bu), 2.63-2.27 (m, 4H, 2'-H, 1'-H), 1.65 (m, 2H, $H2$ -Bu), 1.36 (m, 2H, $H3$ -Bu), 1.14 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3), 0.92 (t, 3H, $J = 7.4$, $H4$ -Bu). ^{13}C RMN (75 MHz, Acetona- d_6): δ 174.8, 174.6, 174.0 (CO), 68.7 (4-C), 53.8 (3-C), 43.1 (C1-Bu), 32.6 (2'-C), 31.3 (C3-Bu), 30.6 (C2-Bu), 22.2 (1'-C), 15.0 (C4-Bu), 11.5 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 258.1 $[M+1]^+$.

(3S,4S)-4-Carboxi-4-(2'-carboxietil)-1-(2,4-diclorobencil)-3-metil-2-azetidinona (2.119d)



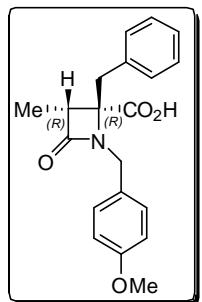
Aceite viscoso. Rdto: 40%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM (0.1 % AcOH):MeOH (Gradiente de 0 a 1% MeOH). $[\alpha]_D = -5.78$ (c 1.23, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 14.42$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min). 1H RMN (300MHz, Acetona- d_6): δ 7.65-7.45 (m, 3H, Ar), 4.80 (d, 1H, $J = 16.1$, 1- CH_2), 4.55 (d, 1H, $J = 16.1$, 1- CH_2), 3.46 (c, 1H, $J = 7.8$, 3-H), 2.51-2.14 (m, 4H, 1'-H, 2'-H), 1.28 (d, 3H, $J = 7.8$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, Acetona- d_6): δ 174.5, 173.3, 170.7 (CO), 135.6, 133.7, 133.2, 130.8, 129.4, 129.3 (C Ar), 69.4 (4-C), 54.4 (3-C), 43.6 (1- CH_2), 31.3 (2'-C), 30.6 (1'-C), 11.4 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 360.0 $[M+1]^+$. Anal (%) Calc. para $C_{15}H_{15}Cl_2NO_5$: C 50.02, H 4.20, N 3.89. Exp (%): C 49.79, H 4.48, N 3.41.

(3S,4S)-4-Carboxi-4-(2'-carboxietil)-1-(3-fenilpropil)-3-metil-2-azetidinona (2.119e)



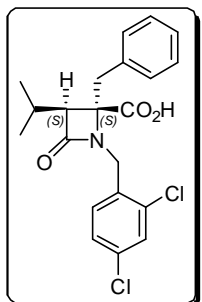
Espuma higroscópica. Rdto: 11%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM (0.1 % AcOH):MeOH (Gradiente de 0 a 1% MeOH). $[\alpha]_D = -28.65$ (*c* 1.64, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 13.86$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). ^1H RMN (300MHz, Acetona- d_6): δ 7.34 (m, 5H, Ar), 3.47-3.25 (m, 3H, 3-*H*, *H*1-Pr), 2.75 (m, 2H, *H*3-Pr), 2.64-2.29 (m, 4H, 1'-*H*, 2'-*H*), 2.12 (m, 2H, *H*2-Pr), 1.24 (d, 3H, *J* = 7.3, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, Acetona- d_6): δ 174.3, 173.4, 169.9 (CO), 143.1, 130.2, 129.6, 129.5, 127.0 (*C* Ar), 68.1 (4-*C*), 53.3 (3-*C*), 42.5 (*C*1-Pr), 34.6 (*C*3-Pr), 33.0 (*C*2-Pr), 31.1 (2'-*C*), 30.5 (1'-*C*), 10.9 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 320.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: C 63.94, H 6.63, N 4.39. Exp (%): C 63.57, H 6.38, N 4.05.

(3R,4R)-4-Bencil-4-carboxi-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-azetidinona (2.124)



Aceite viscoso. Rdto: 24%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 60:1). $[\alpha]_D = -15.9$ (*c* 0.79, MeOH). HPLC (Sunfire): $t_R = 17.79$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). EM (ES modo positivo): 340.3 $(\text{M}+1)^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: C 70.78, H 6.24, N 4.13. Exp (%): C 70.43, H 6.48, N 4.07. Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN son idénticos a los de su enantiómero **2.116a**.

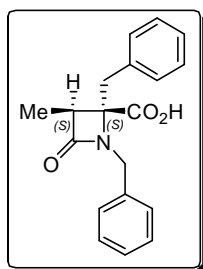
(3S,4S)-4-Bencil-4-carboxi-1-(1,4-diclorobencil)-3-isopropil-2-azetidinona (2.127)



Sólido. Rdto: 80%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 300:1 a 50:1). P.f. 162-164 °C. $[\alpha]_D = +45.1$ (*c* 0.5, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 23.52$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). ^1H RMN δ : (CDCl_3): 7.34-6.93 (m, 8H, Ar), 4.54 (d, 1H, *J* = 16.3, 1- CH_2), 4.25 (d, 1H, *J* = 16.3, 1- CH_2), 3.37 (d, 1H, *J* = 14.5, 4- CH_2), 3.24 (d, 1H, *J* = 14.5, 4- CH_2), 2.93 (d, 1H, *J* = 10.5, 3-*H*), 2.06 (m, 1H, *CH*-*i*Pr), 1.10 (d, 3H, *J* = 6.5, CH_3 -*i*Pr), 0.95 (d, 3H, *J* = 6.2, CH_3 -*i*Pr). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 176.2, 169.6 (CO), 134.4, 134.0, 133.7, 132.7, 131.6, 130.3, 128.9, 128.5, 127.4, 127.3 (*C* Ar), 68.8 (4-*C*), 65.7 (3-*C*), 42.5 (1- CH_2), 39.6 (4-

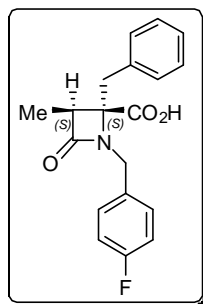
CH₂), 26.4 (CH-ⁱPr), 21.7 (CH₃-ⁱPr), 20.4 (CH₃-ⁱPr). EM (ES modo positivo): 407.1 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₁H₂₁Cl₂NO₃: C 62.08, H 5.21, N 3.45. Exp (%): C 61.89, H 5.58, N 3.17.

(3S,4S)-4-Carboxi-1,4-dibencil-3-metil-2-azetidinona (2.138a)



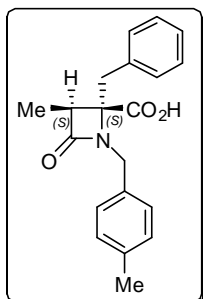
Aceite viscoso. Rdto: 23%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 90:1). $[\alpha]_D = +10.1$ (*c* 1.05, CHCl₃). HPLC (Sunfire): *t_R* = 8.07 min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.30-7.12 (m, 10H, Ph), 4.61 (d, 1H, *J* = 15.6, 1-CH₂), 4.09 (d, 1H, *J* = 15.6, 1-CH₂), 3.36 (d, 1H, *J* = 14.5, 4-CH₂), 3.25 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-H), 3.11 (d, 1H, *J* = 14.5, 4-CH₂), 1.26 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 175.4, 170.4 (CO), 136.8, 136.4, 130.2, 128.7, 127.4, 126.8 (*C* Ar), 69.4 (4-C), 53.5 (3-C), 46.2 (1-CH₂), 35.6 (4-CH₂), 10.1 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 310.3 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₁₉H₁₉NO₃: C 73.77, H 6.19, N 4.53. Exp (%): C 73.82, H 6.23, N 4.19.

(3S,4S)-4-Bencil 4-carboxi-1-*p*-fluorobencil-3-metil-2-azetidinona (2.138b)



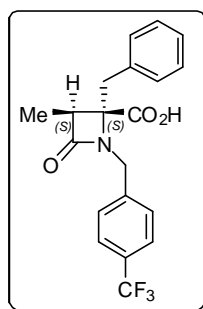
Sólido. Rdto: 59%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (90:1). P.f.: 108-110 °C. $[\alpha]_D = +3.1$ (*c* 1.12, CHCl₃). HPLC (Sunfire): *t_R* = 8.42 min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 9.50 (s ancho, 1H, CO₂H), 7.26-6.94 (m, 9H, Ar), 4.97 (d, 1H, *J* = 15.6, 1-CH₂), 4.12 (d, 1H, *J* = 15.6, 1-CH₂), 3.44 (d, 1H, *J* = 14.4, 4-CH₂), 3.83 (c, 1H, *J* = 7.5, 3-H), 3.09 (d, 1H, *J* = 14.4, 4-CH₂), 1.26 (d, 3H, *J* = 7.5, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 175.1, 170.5 (CO), 162.1 (d, 1C, *J_{C-F}* = 245.9, C₄ Ar), 134.6 (*C* Ar), 132.3 (d, 1C, *J_{C-F}* = 3.3, C₁ Ar), 130.0 (d, 2C, *J_{C-F}* = 7.7, C₂, C₆ Ar), 129.8, 128.5, 127.3 (*C* Ar), 115.2 (d, 2C, *J_{C-F}* = 21.9, C₃, C₅ Ar), 69.3 (4-C), 53.5 (3-C), 45.7 (1-CH₂), 40.5 (4-CH₂), 10.1 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 328.3 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₁₉H₁₈FNO₃: C 69.71, H 5.54, N 4.28. Exp (%): C 69.78, H 5.59, N 4.01.

(3S,4S)-4-Bencil-4-carboxi-3-metil-1-*p*-metilbencil-2-azetidinona (2.138c)



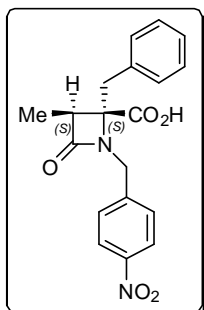
Sólido. Rdto: 62%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 80:1). P.f.: 103-105 °C. $[\alpha]_D = +13.9$ (c 1.05, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 9.79$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.79 (s ancho, 1H, CO_2H), 7.18-6.91 (m, 9H, Ph), 4.57 (d, 1H, $J = 15.5$, 1- CH_2), 4.08 (d, 1H, $J = 15.5$, 1- CH_2), 3.31 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 3.22 (c, 1H, $J = 7.6$, 3- H), 3.11 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 2.33 (s, 3H, CH_3), 1.24 (d, 3H, $J = 7.6$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.0, 170.7 (CO), 137.0, 134.7, 133.3, 129.9, 128.4, 127.2 (C Ar), 69.2 (4-C), 52.9 (3-C), 46.1 (1- CH_2), 40.2 (4- CH_2), 21.1 (CH_3), 10.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 324.2 $[\text{M}+1]^+$. Anal (%) Calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_3$: C 74.28, H 6.55, N 4.33. Exp (%): C 74.32, H 6.63, N 4.27.

(3S,4S)-4-Bencil 4-carboxi-3-metil-1-*p*-trifluorometilbencil-2-azetidinona (2.138d)



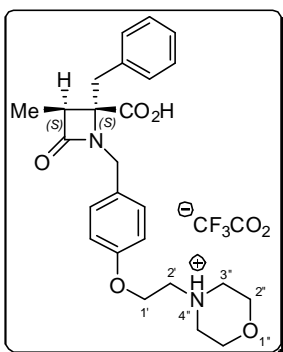
Espuma higroscópica. Rdto: 28%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (100:1). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.6$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 7.52 (d, 2H, $J = 8.1$, 2- H y 6- H Ar), 7.30-7.12 (m, 5H, Ph), 6.95 (d, 2H, $J = 8.1$, 3- H y 5- H Ar), 4.51 (d, 1H, $J = 16.0$, 1- CH_2), 4.08 (d, 1H, $J = 16.0$, 1- CH_2), 3.53 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 3.30 (c, 1H, $J = 7.5$, 3- H), 3.07 (d, 1H, $J = 14.4$, 4- CH_2), 1.28 (d, 3H, $J = 7.5$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.2, 170.5 (CO), 140.7 134.5, 129.7, 129.4 (C Ar), 129.2 (d, 1C, $J_{\text{C-F}} = 34.3$, C_4 Ar), 128.6, 128.4, 127.7 (C Ar), 127.8 (c, 1C, $J_{\text{C-F}} = 262.8$, CF_3), 69.5 (4-C), 54.0 (3-C), 46.0 (1- CH_2), 40.9 (4- CH_2), 10.2 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 378.3 $[\text{M}+1]^+$.

(3*S*,4*S*)-4-Bencil-4-carboxi-3-metil-1-*p*-nitrobencil-2-azetidinona (2.138e)



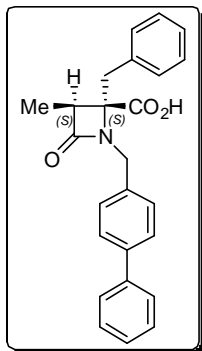
Espuma. Rdto: 32%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 100:1 a 80:1). HPLC (Sunfire): $t_R = 0.89$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 5 min). ^1H RMN (300MHz, Acetona- d_6): δ 8.15 (d, 2H, $J = 8.6$, 3-*H* y 5-*H* Ar), 7.62 (d, 2H, $J = 8.6$, 2-*H* y 6-*H* Ar), 7.14-7.03 (m, 5H, Ph), 5.32 (s, 2H, 1- CH_2), 2.85 (d, 1H, $J = 14.3$, 4- CH_2), 2.79 (c, 1H, $J = 7.2$, 3-*H*), 2.68 (d, 1H, $J = 14.3$, 4- CH_2), 0.95 (d, 3H, $J = 7.2$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, Acetona- d_6): δ 178.6, 175.8 (CO), 149.5, 148.6, 139.2, 131.7, 131.2, 129.7, 128.2, 124.9 (C Ar), 63.2 (4-C), 59.2 (1- CH_2), 44.8 (3-C), 41.6 (4- CH_2), 13.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 355.2 $[\text{M}+1]^+$.

Trifluoroacetato de (3*S*,4*S*)-4-bencil-4-carboxi-3-metil-1-*p*-[(2'-morfolin-4''-il)etoxi]bencil-2-azetidinona (2.138g)



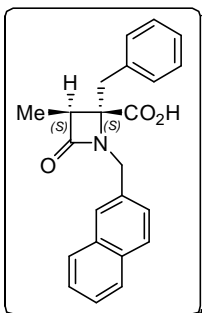
Espuma higroscópica. Rdto: 42%. Cartucho de fase reversa. Eluyente: H_2O :MeCN (Gradiente de 0 a 5% MeCN). $[\alpha]_D = +7.3$ (c 0.98, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 5.36$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ^1H RMN (300MHz, CDCl_3): δ 10.52 (s ancho, 1H, CO_2H), 7.22 (d, 2H, $J = 7.6$, 2-*H* y 6-*H* Ar), 7.20-7.04 (m, 5H, Ph), 6.86 (d, 2H, $J = 7.6$, 3-*H* y 5-*H* Ar), 4.44 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 4.19 (m, 2H, 1'-*H*), 4.03 (d, 1H, $J = 15.4$, 1- CH_2), 3.68 (m, 4H, 2''-*H*), 3.37 (d, 1H, $J = 14.2$, 4- CH_2), 3.18 (d, 1H, $J = 14.2$, 4- CH_2), 3.08 (c, 1H, $J = 7.6$, 3-*H*), 2.91 (m, 2H, 2'-*H*), 2.71 (m, 4H, 3''-*H*), 1.14 (d, 3H, $J = 7.6$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 175.1, 170.1 (CO), 156.8, 136.1, 130.4, 130.1, 129.9, 128.2, 126.8, 114.2 (C Ar), 69.5 (4-C), 64.7 (2''-C), 63.7 (1'-C), 56.5 (2'-C), 52.8 (3''-C), 52.5 (3-C), 45.4 (1- CH_2), 40.8 (4- CH_2), 10.5 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 439.5 $[\text{M}+1]^+$.

(3S,4S)-4-Bencil-4-carboxi-1-*p*-fenilmetil-3-metil-2-azetidinona (2.138h)



Sólido. Rdto: 35%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (90:1). P.f.: 158-160 °C. $[\alpha]_D = +7.7$ (*c* 1.06, CHCl₃). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.46$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.60-7.12 (m, 8H, Ar), 6.90 (m, 6H, Ar), 4.63 (d, 1H, $J = 15.6$, 1-CH₂), 4.12 (d, 1H, $J = 15.6$, 1-CH₂), 3.41 (d, 1H, $J = 14.5$, 4-CH₂), 3.28 (c, 1H, $J = 7.5$, 3-H), 3.13 (d, 1H, $J = 14.5$, 4-CH₂), 1.28 (d, 3H, $J = 7.5$, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 175.5, 170.6 (CO), 140.6, 140.3, 135.5, 134.6, 129.9, 129.4, 128.8, 127.3, 127.0 (C Ar), 69.3 (4-C), 53.3 (3-C), 46.1 (1-CH₂), 40.4 (4-CH₂), 10.2 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 386.2 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₅H₂₃NO₃: C 77.90, H 6.01, N 3.63. Exp (%): C 77.95, H 6.08, N 3.37.

(3S,4S)-4-Bencil-4-carboxi-3-metil-1-(2-naftilmetil)-2-azetidinona (2.138i)

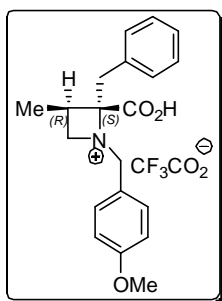


Espuma. Rdto: 32%. Cartucho de fase normal. Eluyente: DCM:MeOH (90:1). HPLC (Sunfire): $t_R = 10.4$ min (Gradiente de 0 a 100% A en 15 min). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7.83-6.87 (m, 12H, Ph), 4.75 (d, 1H, $J = 15.7$, 1-CH₂), 4.23 (d, 1H, $J = 15.7$, 1-CH₂), 3.38 (d, 1H, $J = 14.5$, 4-CH₂), 3.26 (c, 1H, $J = 7.5$, 3-H), 3.08 (d, 1H, $J = 14.5$, 4-CH₂), 1.91 (d, 3H, $J = 7.5$, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 176.1, 168.2 (CO), 138.1, 137.3, 134.6, 133.9, 131.7, 129.4, 128.7, 128.5, 128.3, 127.6, 127.1, 128.8, 126.2, 125.8 (C Ar), 69.3 (4-C), 52.3 (3-C), 47.6 (1-CH₂), 41.3 (4-CH₂), 11.2 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 360.3 [M+1]⁺.

Procedimiento general para la reducción de β -lactamas a azetidinas en fase sólida

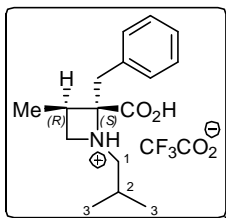
Las resinas **2.112 a,b,d** (0.15 mmol) se hinchan con DCM (5 x 0.5 min) y THF (2 x 0.5 min). A continuación se añade una disolución de $\text{RhH}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_3$ (0.007 mmol) y Ph_2SiH_2 (1.5 mmol) bajo atmósfera de Ar. Se deja reaccionar durante 15 h en atmósfera inerte. Transcurrido ese tiempo, se elimina el exceso de reactivos y se lava con THF/DMF:MeOH(1:1)/DMF/DCM:MeOH(1:1)/DCM (5 x 0.5 min). Se repite la reacción dos veces más. Finalmente se elimina el exceso de reactivos mediante filtración y tras lavados con THF/DMF:MeOH(1:1)/DMF/DCM:MeOH(1:1)/DCM (5 x 0.5 min), la resina se seca a vacío. Las resinas (0.15 mmol) se tratan con 1.5 ml de una mezcla de TFA/ H_2O (95:5) a temperatura ambiente durante 3 h. Pasado este tiempo se recoge el filtrado y se lava la resina con DCM (3 x 3 ml) recogiendo con el resto de los filtrados en un matraz. Se elimina el disolvente a presión reducida y la mezcla resultante se liofiliza. Los crudos de reacción se purifican con cartuchos de extracción de gel de sílice.

Trifluoroacetato de (2*S*,3*R*)-2-bencil-2-carboxi-3-metil-1-*p*-metoxibencilazetidina (**2.133a**)



Aceite viscoso. Rdto: 20%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 200:1 a 10:1). $[\alpha]_D = -7.9$ (c 0.25, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 15.87$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). ^1H RMN ($\text{MeOH}-d_4$) δ : 7.51 (d, 2H, $J = 8.7$, 2-*H* y 6-*H* Pmb), 6.92 (d, 2H, $J = 8.7$, 3-*H* y 5-*H* Pmb), 7.43-7.14 (m, 5H, Ph), 4.34-2.96 (m, 6H, 4-*H*, 2- CH_2 y 1- CH_2), 2.79 (m, 1H, 3-*H*), 1.20 (d, 3H, $J = 6.9$, 3- CH_3). EM (ES modo positivo): 326.3 $[\text{M}+1]^+$.

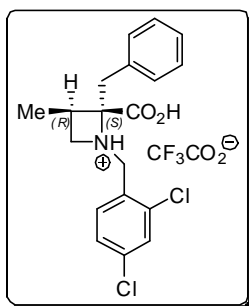
Trifluoroacetato de (2*S*,3*R*)-2-bencil-2-carboxi-1-isobutil-3-metilazetidina (**2.133b**)



Espuma. Rdto: 25%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 200:1 a 10:1). $[\alpha]_D = -53.8$ (c 0.47, CHCl_3). HPLC (Sunfire): $t_R = 15.39$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). ^1H RMN ($\text{MeOH}-d_4$) δ : 7.47-7.21 (m, 5H, Ph), 4.08 (m, 1H, 4-*H*), 3.76 (m, 1H, 2- CH_2), 3.72 (m, 1H, 4-*H*), 3.52 (m, 1H, 2- CH_2), 2.89 (m, 1H, $H1$ -*i*Bu), 2.74 (m, 1H, 3-*H*), 2.70 (m, 1H, $H1$ -*i*Bu), 1.52 (m, 1H,

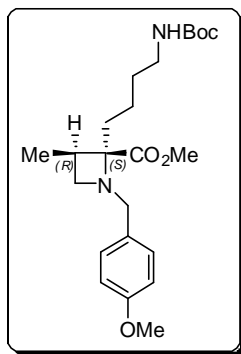
$H2$ - i Bu), 1.26 (d, 3H, $J = 6.9$, 3- CH_3), 0.91 (d, 3H, $J = 6.4$, $H3$ - i Bu), 0.72 (d, 3H, $J = 6.0$, $H3$ - i Bu). ^{13}C RMN (MeOH- d_4) δ : 172.3 (CO $_2$ H), 136.8, 130.9, 129.8, 128.3 (C Ar), 83.5 (2-C), 58.9 (C1- i Bu), 56.3 (4-C), 39.2 (2- CH_2), 36.3 (3-C), 26.0 (C2- i Bu), 20.5 (C3- i Bu), 20.1 (C3- i Bu), 15.4, (CH $_3$). EM (ES modo positivo): 262.2 [M+1] $^+$.

Trifluoroacetato de (2*S*,3*R*)-2-bencil-2-carboxi-1-(2,4-diclorobencil)-3-metilazetidina (2.123d)



Aceite viscoso. Rdto: 29%. Cartucho de gel de sílice. Eluyente: DCM:MeOH (Gradiente de 200:1 a 10:1). $[\alpha]_D = -5.6$ (c 0.45, CHCl $_3$). HPLC (Sunfire): $t_R = 18.43$ min. (Gradiente de 0 a 100% A en 30 min.). 1H RMN (MeOH- d_4) δ : 7.56-7.20 (m, 8H, Ph), 4.40-3.00 (m, 6H, 4- H , 2- CH_2 y 1- CH_2), 2.88 (m, 1H, 3- H), 1.21 (d, 3H, $J = 7.1$, 3- CH_3). ^{13}C RMN (MeOH- d_4) δ : 137.4, 137.2, 136.7, 136.4, 134.5, 134.2, 130.9, 130.4, 129.9, 128.9, 128.5 (C Ar), 86.4 (2-C), 52.3 (4-C), 41.3 (1- CH_2), 37.8 (2- CH_2), 36.8 (3-C), 15.1 (3- CH_3). EM (ES modo positivo): 365.1 [M+1] $^+$.

Síntesis de (2*S*,3*R*)-2-(4'-*tert*-butoxicarbonilamino)butil-3-metil-1-*p*-metoxibencil-2-metoxycarbonilazetidina (2.134)



A una disolución de la azetidina **2.85a** (0.14 g, 0.32 mmol) en THF seco (8 ml), en atmósfera de Ar, se le adiciona hidruro de tris(trifenilfosfina)carbonil rodio (I) (2.8 mg, 1%) y difenilsilano (0.15 ml, 0.78 mmol). Después de 15 h de reacción a temperatura ambiente, se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se disuelve en éter etílico y se lava sucesivas veces con disolución 1M de HCl. La fase acuosa se lleva a pH 10 con NaOH 2N y se extrae con AcOEt. Esta segunda fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl y seca sobre Na $_2$ SO $_4$. El crudo resultante se purifica en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt:hexano (1:6), obteniéndose 0.11 g del producto **2.134** (84 %) en forma de aceite. $[\alpha]_D = -23.6$ (c 0.87, CHCl $_3$). HPLC (DeltaPak): $t_R = 4.63$ min (A:B = 40:60). 1H RMN (300 MHz, CDCl $_3$): 1H RMN (300 MHz, CDCl $_3$) δ 7.18 (d, 2H, $J = 8.5$, 2*H* y 6*H* Pmb), 6.78 (d, 2H, $J = 8.5$, 3*H*

y 5H Pmb), 4.52 (m, 1H, 4'-NH), 3.95 (d, 1H, $J = 14.3$, 1-CH₂), 3.71, 3.84 (s, 3H, OMe), 3.43 (d, 1H, $J = 14.3$, 1-CH₂), 3.24 (m, 1H, 4-H), 3.12 (m, 2H, 4'-H), 2.84 (m, 1H, 4-H), 2.44 (m, 1H, 3-H), 1.76 (m, 2H, 1'-H), 1.47 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.35 (m, 4H, 2'-H y 3'-H), 0.98 (d, 3H, $J = 7.3$, 3-CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 170.3, 165.4 (CO), 158.8, 128.2, 127.3, 111.8 (C Ar), 80.6 (2-C), 78.6 (C ^tBu), 56.4, 55.3 (OMe), 48.6 (1-CH₂), 44.3 (4-C), 38.4 (4'-C), 33.5 (1'-C), 27.5 (3-C), 28.4 (3'-C), 26.1 (CH₃ ^tBu), 20.2 (2'-C), 11.8 (3-CH₃). EM (ES modo positivo): 421.4 [M+1]⁺. Anal (%) Calc. para C₂₃H₃₆N₂O₅: C 65.69, H 8.63, N 6.66. Exp (%): C 65.73, H 8.72, N 6.48.

2.6.7. Cálculos ab initio de estados de transición

La geometría de las estructuras se ha optimizado inicialmente con el método híbrido HF/DFT B3LYP y la base 6-31G* incluida en el programa Gaussian-03. Los cálculos de las frecuencias se han llevado a cabo al mismo nivel computacional para confirmar que los estados obtenidos se corresponden al mínimo de energía o a estados de transición puros (ninguna y una frecuencia imaginaria, respectivamente). Posteriormente, se optimizaron y calcularon las frecuencias de las estructuras al mismo nivel de cálculo (B3LYP) y con la base 6-311++G**.

Estos estudios han sido realizados por el Dr. Ibon Alkorta en el Instituto de Química Médica.

2.6.8. Ensayos biológicos

2.6.8.1. Evaluación de la inhibición de la replicación viral del CMVH

El ensayo de la inhibición de la replicación viral del CMVH ha sido descrito detalladamente en el Capítulo 1 (página 103).

2.6.8.1. Evaluación de la capacidad bloqueante de los canales iónicos TRPV1 y TRPM8

En estos ensayos se utilizaron líneas celulares SH-SY5Y y HEK-CR1, transfectadas con plásmidos de TRPV1 y TRPM8, respectivamente. La cuantificación de la capacidad bloqueante de los canales iónicos por los compuestos a ensayar se determinó mediante el cálculo de la concentración intracelular de Ca²⁺ a través de medidas de fluorescencia,

empleando la sonda molecular Fluo-4-AM. Los ensayos se realizaron en una multiplaca de 96 pocillos. Las células fueron tratadas con 100 μ l de una disolución de Fluo-4 NW y probenecid 2.5 mM. A continuación se añadieron los compuestos a las concentraciones deseadas (5 y 50 μ M) y se incubaron a 37°C durante 30 min y temperatura ambiente durante otros 30 min. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un equipo POLARstar Omega BMG LAB tech a las longitudes de onda 485 nm (excitación) y 520 nm (emisión). Para la activación de los canales se añadió capsaicina 5 μ M, en el caso de TRPV1, y mentol 150 μ M, para TRPM8. Como control del bloqueo de los canales se añadió en ambos casos Arg 15-15 a 50 μ M.

Estos ensayos fueron realizados por el equipo del Dr. Ferrer Montiel en la Universidad Miguel Hernández

2.6.8.3. Evaluación de la actividad antitumoral

El ensayo de citotoxicidad en las líneas celulares MDA-MB-231 (mama), A-549 (pulmón) y HT-29 (colon), se realizó en multiplaca de 96 pocillos, utilizando el método del NCI (National Cancer Institute)¹³¹. El crecimiento celular se evaluó tras 48 horas de incubación en presencia o ausencia de los compuestos a ensayar. El resultado se expresa como la inhibición de crecimiento respecto al control sin tratar. La cuantificación del ensayo se realizó por colorimetría mediante tinción con sulforodamina B (SRB). En el ensayo se determinan tres valores críticos: GI_{50} , concentración que produce una inhibición del crecimiento del 50%.

Estos ensayos fueron realizados por la empresa farmacéutica PharmaMar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Woodward, R. B.; Neubergher, A.; Trenner, N. R. *In The Chemistry of Penicillin*; Clarke, H. J.; Johnson, J. R.; Robinson, R., Eds. Princeton University Press: Princeton, NJ **1949**, 415-439.
- 2) Morin, R.B.; German, M., Eds. *Chemistry and Biology of β -lactam antibiotics*. Academic Press: New York, **1982**.
- 3) Singh, G.S. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 69 y 93.
- 4) Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072-5129.
- 5) Rothstein, J.D.; Patel, S.; Regan, M.R.; Haenggeli, C.; Huang, Y.H.; Bergles, D.E.; Jin, L.; Hoberg, M.D.; Vidensky, S.; Chung, D.S.; Toan, S.V.; Bruijn, L.I.; Su, Z-Z.; Pankaj Gupta, P.; Fisher, P.B. *Nature*, **2005**, *433*, 73-77.
- 6) Miller, T.M.; Cleveland, D.W. *Science*, **2005**, *307*, 361-362.
- 7) Sutton, J.C.; Bolton, S. A.; Hartl, K. S.; Huang, M.-H.; Jacobs, G.; Meng, W.; Ogletree, M. L.; Pi, Z.; Schumacher, W. A.; Seiler, S. M.; Slusarchyk, W. A.; Treuner, U.; Zalher, R.; Zhao, G.; Bisacchi, G. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3229-3233.
- 8) Bisacchi, G. S.; Slusarchyk, W. A.; Bolton, S. A.; Hartl, K. S.; Jacobs, G.; Mathur, A.; Meng, W.; Ogletree, M. L.; Pi, Z.; Sutton, J.C.; Treuner, U.; Zalher, R.; Zhao, G.; Seiler, S. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3229-3233.
- 9) Han, W.T.; Trehan, A.K.; Wright, J.J.K.; Federici, M.E.; Seiler, S.M.; Meanwell, N.A. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1123-1143.
- 10) Doherty, J.B.; Shah, S.K.; Finke, P.E.; Dorn, C.P.; Hagmann, W.K.; Hale, J.J.; Kissinger, A.L.; Thompson, K.R.; Brause, K.; Chandler, G.; Knight, W.B.; Maycock, A.L.; Ashe, B.M.; Weston, H.; Gale, P.; Mumford, R.A.; Andersen, F.; Williams, H.R.; Nolan, T.E.; Frankenfield, D.L.; Underwood, D.; Vyas, K.P.; Kari, P.H.; Dahlgrent, M.E.; Mao, J.; Fletcher, D.S.; Dellea, P.S.; Hand, K.M.; Osinga, D.G.; Peterson, L.B.; Williams, D.T.; Metzger, J.M.; Bonney, R.J.; Humes, J.L.; Pacholok, S.P.; Hanlon, W.A.; Opas, E.; Stolk, J.; Davies, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 8727-8731.
- 11) Finke, P.E.; Shah, S.K.; Fletcher, D.S.; Ashe, B.M.; Brause, K.; Chandler, G.; Dellea, P.S.; Hand, K.M.; Maycock, A.L.; Osinga, D.G.; Underwood, D.; Weston, H.; Davies, P.; Doherty, J.B. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2449-2462.
- 12) Clemente, A.; Domingos, A.; Grancho, A. P.; Iley, J.; Moreira, R.; Neres, J.; Palma, N.; Santana, A. B.; Valente, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1065-1068.

- 13) Gérard, S.; Galleni, M.; Dive, G.; Marchand-Brynaert, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 129-138.
- 14) Moreira, R.; Santana, A.B.; Iley, J.; Douglas, K.T.; Horton, P.N.; Hursthouse, M.B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4861-4870.
- 15) Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Becker, G. W.; Chen, B.; Cheng, L.; Cooper, S. L.; Hermann, R. B.; Howe, T. J.; McCoull, W.; McNulty, A. M.; Neubauer, B. L.; Pritchard, G. *J. J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1491-1508.
- 16) Yoakim, C.; Ogilvie, W.; Cameron, D. R.; Chabot, C.; Guse, I.; Haché, B.; Naud, J.; O'Meara, J. A.; Plante, R.; Déziel, R. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2882-2891.
- 17) Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M.J.; García-López, M.T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; González-Muñiz, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2612-2621.
- 18) Rosenblum, S.B.; Huynh, T.; Afonso, A.; Davis, H.R.; Yumibe, N.; Clader, J.W.; Burnett, D.A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 973-980.
- 19) Clader, J.W. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1-19.
- 20) Clader, J.W. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 243-256.
- 21) Kværnø, L.; Werder, M.; Hauser, H.; Carreira, E. M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6035-6053.
- 22) Smith, D.M.; Kazi, A.; Smith, L.; Long, T.E.; Heldreth, B.; Turos, E.; Dou, Q.P. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 1348-1358.
- 23) Kazi, A.; Hill, R.; Long, T.E.; Kuhn, D.J.; Turos, E.; Dou, Q.P. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 365-374.
- 24) Chen, D.; Falsetti, S.C.; Frezza, M.; Milacic, V.; Kazi, A.; Cui, Q.C.; Long, T.E.; Turos, E.; Dou, Q.P. *Cancer Lett.* **2008**, *268*, 63-69.
- 25) Imbach, P.; Lang, M.; García-Echeverría, C.; Guagnano, V.; Noorani, M.; Roesel, J.; Bitsh, F.; Rihs, G.; Furet, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 358-362.
- 26) Nicolau, K.C.; Dai, W.M. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* **1991**, *32*, 1387-1416.
- 27) Shen, B.; Liu, W.; Nonaka, K. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2317-2325.
- 28) Banfi, L.; Basso, A.; Bevilacqua, E.; Gandolfo, V.; Giannini, G.; Guanti, G.; Musso, L.; Paravidino, M.; Riva, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3501-3518.
- 29) Banik, I.; Becker, F.F.; Banik, B.K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 12-15.
- 30) Banik, B.K.; Becker, F.F.; Banik, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2523-2528.
- 31) Veinberg, G.; Bokaldere, R.; Dikovskaya, K.; Vorona, M.; Kanepe, I.; Shestakova, I.; Yashchenko, E.; Lukevics, E. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2003**, *39*, 587-593.
- 32) Veinberg, G.; Vorona, M.; Musel, D.; Bokaldere, R.; Shestakova, I.; Kanepe, I.; Lukevics, E. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2004**, *40*, 816-822.

- 33) Veinberg, G.; Shestakova, I.; Vorona, M.; Kanepe, I.; Lukevics, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *12*, 147-150.
- 34) Ruf, S.; Neudert, G.; Gürtler, S.; Grünert, R.; Bednarski, P.J.; Otto, H-H. *Monatsh. Chem.* **2008**, *139*, 847-857.
- 35) Palomo, C.; Aizpurua, J.M.; Ganboa, I.; Oiarbide, M. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1837-1872.
- 36) Deshmukh, A.R.A.S.; Bhawal, B.M.; Krishnaswamy, D.; Govande, V.; Shinkre, A.; Jayanthi, A. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1889-1920.
- 37) Alcaide, B.; Almendros, P. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1921-1949.
- 38) Alcaide, B.; Almendros, P.; Aragoncillo, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4437-4492.
- 39) Alcaide, B.; Almendros, P. Cabrero, G.; Ruiz, M. P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7980-7991.
- 40) Alcaide, B.; Almendros, P. Cabrero, G.; Ruiz, M. P. *Chem. Commun.* **2008**, 615-617.
- 41) Alcaide, B.; Almendros, P. Cabrero, G.; Ruiz, M. P. *Chem. Commun.* **2007**, 4788-4790.
- 42) Alcaide, B.; Almendros, P. Carrascosa, R.; Redondo, M. C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 637-643.
- 43) Alcaide, B.; Almendros, P. Aragoncillo, C.; Redondo, M. C.; Torres, M. R. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1539-1546.
- 44) Alcaide, B.; Almendros, P. Martínez del Campo, T.; Rodríguez-Acebes, R. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 749-758.
- 45) Alcaide, B.; Almendros, P. Martínez del Campo, T.; Soriano, E. Marco-Contelles, J. L. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1901-1908.
- 46) Alcaide, B.; Almendros, P. Martínez del Campo, T.; Soriano, E. Marco-Contelles, J. L. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1909-1928.
- 47) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Galarza, R.; Khamrai, U. K.; Vázquez, J.; De Pascual-Teresa, B.; Nieto, P. M.; Linden, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3056-3058.
- 48) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Miranda, J. I.; Fratila, R. M.; Matute, C.; Domercq, M.; Gago, F.; Martín-Santamaría, S.; Linden, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16243-16260.
- 49) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Ganboa, I.; Benito, A.; Cuervo, L.; Fratila, R. M.; Jiménez, A.; Loinaz, I.; Miranda, J. I.; Pytlewska, K. R.; Micle, A.; Linden, A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4443-4446.
- 50) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Balentová, E.; Jiménez, A.; Oyarbide, J.; Fratila, R. M.; Miranda, J. I. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 101-104.
- 51) Maier, T.C.; Frey, W.U.; Podlech, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *16*, 2688-2689.

- 52) Alonso, E.; López-Ortiz, F.; Del Pozo, C.; Peralta, E.; Macías, A.; González, J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6333-6338.
- 53) Brandi, A.; Cicchi, S.; Cordero, F.M. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3988-4035.
- 54) Aranda, M.T.; Pérez-Faginas, P.; González-Muñiz, R. *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 325-341.
- 55) Staudinger, H. *Liebigs. Ann. Chem.* **1907**, *51*, 356-358.
- 56) Jiao, L.; Liang, Y.; Xu, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6060-6069.
- 57) Cossío, F.P.; Arrieta, A.; Sierra, M.A. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 925-936.
- 58) Govande, V.V.; Deshmukh, A.R.A.S. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6563-6566.
- 59) Banik, B.K.; Becker, F.F. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6551-6554.
- 60) Banik, B.K.; Banik, I.; Becker, F.F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3611-3622.
- 61) Guillo, C.D.; Koppel, G.A.; Brownstein, M.J.; Chaney, M.O.; Ferris, C.F.; Lu, S-F.; Fabio, K.M.; Miller, M.J.; Heindel, N.D.; Hunden, D.C.; Cooper, R.D.G.; Kaldor, S.W.; Skelton J.J.; Dressman, B.A.; Clay, M.P.; Steinberg, M.I.; Bruns, R.F.; Simon, N.G. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2054-2080.
- 62) Shinke, B.A.; Puranik, V.G.; Deshmukh, A.R.A.S. *Tetrahedron Asymmetry*, **2003**, *14*, 453-459.
- 63) Joshi, S.N.; Deshmukh, A.R.A.S.; Bhawal, B.M. *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, *11*, 1477-1485.
- 64) Karupaiyan, K.; Puranik, V.G.; Deshmukh, A.R.A.S.; Bhawal, B.M. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 8555-8560.
- 65) Chincholkar, P.M.; Puranik, V.G.; Deshmukh, A.R.A.S. *Tetrahedron*, **2007**, *57*, 9179-9187.
- 66) Dondoni, A.; Massi, A.; Sabbatini, S.; Bertolasi, V. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1355-1360.
- 67) Van Brabandt, W.; Vanwalleghe, M.; D'hooghe, M.; De Kimpe, N. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7083-7086.
- 68) Alcaide, B.; Almendros, P.; Aragoncillo, C.; Rodríguez-Acebes, R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 826-831.
- 69) Macías, A.; Alonso, E.; del Pozo, C.; Venturini, A.; González, C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7004-7012.
- 70) Del Buttero, P.; Molteni, G.; Papagni, A. *Tetrahedron Asymmetry*, **2003**, *14*, 3949-3953.
- 71) Fernández, R.; Ferrete, A.; Lassaletta, J. M.; Llera, J. M.; Martín-Zamora, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 831-833.

- 72) Díez, E.; Fernández, R.; Marqués-López, E.; Martín-Zamora, E.; Lassaletta, J. M. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2749-2752.
- 73) Fernández, R.; Ferrete, A.; Lassaletta, J.M; Llera, J.M.; Monge, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2893-2897.
- 74) Hogan, P. C.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15386-15387.
- 75) France, S.; Weatherwax, A.; Taggi, A. E.; Lectka, T. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 592-560.
- 76) Hodous, B.L.; Fu, G.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1578-1579.
- 77) Zhang, Y-R.; He, L.; Wu, X.; Shao, P.L.; Ye, S. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 277-280.
- 78) Gilman, H.; Speeter, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 2250-2261.
- 79) Chen, L.; Zhao, G.; Ding, Y. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2611-.
- 80) Boyer, N.; Gloanec, P.; De Nanteuil, G.; Jubault, P.; Quirion, J.-C. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 12352-12366.
- 81) Hashimoto, Y.; Ogasawara, T.; Hayashi, M.; Saigo, K. *Heterocycles*, **2000**, *52*, 1001-1004.
- 82) Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 563-572.
- 83) Marco-Contelles, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2198-2200.
- 84) Gyarmaty, Z.C.; Liljeblad, A.; Argay, G.; Kalman, A.; Bernath, G.; Kanerva, L.T. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 566-572.
- 85) Troisi, L.; De Vitis, L.; Granito, C.; Pilati, T.; Pindinelli, E. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 6895-6900.
- 86) Angelaud, R.; Zhong, Y.-L.; Maligres, P.; Lee, J.; Askin, D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1949-1952.
- 87) Vassiliou, S.; Dimitropoulos, C.; Magriotis, P. A. *Synlett*, **2003**, 2398-2400.
- 88) Pandey, G.; Dumbre, S. G.; Khan, M. I.; Shabab, M.; Puranik, V. G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7923-7926.
- 89) Whisler, M. C.; Beak, P. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1207-1215.
- 90) Pirrung, M. C.; Das Sarma, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *45*, 444-445.
- 91) Grainger, R. S.; Innocenti, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3445-3448.
- 92) Toyofuku, M.; Fujiwara, S. I.; Shin-Ike, T.; Kuniyasu, H.; Kambe, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9706-9707.
- 93) Qian, X.; Zheng, B.; Burke, B.; Saindane, M. T.; Kronenthal, D. R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3595-3600.
- 94) Feroci, M.; Lessard, J.; Orsini, M.; Inesi, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8517-8519.
- 95) Feroci, M. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2177-2181.

- 96) Snyder, J. P.; Padwa Stendel, T.; Arduengo, A. J.; Jockish, A.; Kim, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11318-11319.
- 97) Ruhland, B.; Bhandari, A.; Gordon, E. M.; Gallop, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 253-254.
- 98) Gordon, K.; Bolger, M.; Khan, N.; Balasubramanian, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8621-8625.
- 99) Wills, A. J.; Krishnan-Ghosh, Y.; Balasubramanian, S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6646-6652.
- 100) Delpiccolo, C. M. L.; Mata, E. G. *Tetrahedron Asymmetry*, **2002**, *13*, 905-910.
- 101) Delpiccolo, C. M. L.; Fraga, M. A.; Mata, E. G. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 208-210.
- 102) Méndez, L.; Testero, S. A.; Mata, E. G. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 189-192.
- 103) Poeylout-Palena, A. A.; Mata, E. G. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 791-794.
- 104) Gordon, K.; Balasubramanian, S. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 53-56.
- 105) Schunk, S.; Enders, D. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 907-910.
- 106) Schunk, S.; Enders, D. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8034-8042.
- 107) Meloni, M. M.; Taddei, M. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 337-340.
- 108) Annunziata, R.; Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 133-138.
- 109) Shou, W.-G.; Yang, Y.-Y.; Wang, Y.-G. *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 866-867.
- 110) Shou, W.-G.; Yang, Y.-Y.; Wang, Y.-G. *Synthesis*, **2005**, 530-536.
- 111) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Herranz, R.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3538-3547.
- 112) Gerona-Navarro, G.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3953-3956.
- 113) Fuji, K.; Kawabata, T. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 373-376.
- 114) Kawabata, T.; Fuji, K. "Topics in Stereochemistry". Denmark, S.E., Ed.; Wiley & Sons. Inc. **2003**, *23*, 175-205.
- 115) Zhao, H.; Hsu, D.C.; Carlier, P.R., *Synthesis*, **2005**, 1-16.
- 116) Bonache, M. A.; Gerona-Navarro, G.; García-Aparicio, C.; Alías, M.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2161-2169.
- 117) Bonache, M. A.; Gerona-Navarro, G.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Synlett* **2003**, *7*, 1007-1011.
- 118) Gerona-Navarro, G.; Royo, M.; García-López, M. T.; Albericio, F.; González-Muñiz, R. *Mol. Divers.* **2003**, *6*, 75-84.

- 119) González-Muñiz, R.; Cornille, F.; Bergeron, F.; Ficheux, D.; Pothier, J.; Durieux, C.; Roques, B. P. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 331-340.
- 120) Fournié-Zaluski, M. C.; Lucas-Soroca, F.; Devin, J.; Roques, B. P. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 751-757.
- 121) Juaristi, E.; López-Ruiz, H.; Madrigal, D.; Ramírez-Quirós, Y.; Escalante, J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4706-4710.
- 122) Vágo, I.; Greiner, I. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6039-6041.
- 123) Pluempunapat, W.; Chantarasriwong, O.; Taboonpong, P.; Jang, D.; Chavarisi, W. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 223-226.
- 124) Szardenings, A. K.; Burkoth, T. S.; Look, G. C.; Campbell, D. A.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6720-6722.
- 125) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Alías, M.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2193-2196.
- 126) Patchett, A. A.; Nargund, R. P. *Ann. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 289-298.
- 127) Szallasi, A.; Cotright, D. N.; Blum, C. A.; Eid, S. R. *Nature Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 357-372.
- 128) Patapoutian, A.; Tate, S.; Woolf, C. J. *Nature Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 55-68.
- 129) Kauer, J. A.; Gibson, H. E. *Trends Neurosci.* **2009**, *32*, 215-223.
- 130) Prevarskaya, N.; Zhang, L.; Barritt, G. *Biochem. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 937-946.
- 131) Boyd, M. R.; Paull, K. D. *Drug Dev. Res.* **1995**, *34*, 91-104.